

September 2019

therascreen[®] PIK3CA RGQ PCR Kit Gebrauchsanweisung (Handbuch)



Version 1

IVD

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Zur Verwendung mit Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM Instrumenten

Zur Verwendung mit dem QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

Zur Verwendung mit dem QIAamp[®] DSP Circulating Nucleic Acid Kit



REF

873111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden,
Deutschland

R2 **MAT**

1116336DE

Sample to Insight



Inhalt

Verwendungszweck	5
Einschränkungen des Verfahrens	6
Zusammenfassung und Erläuterung des Tests.....	9
Verfahrensprinzip	11
Mutationsreaktionsgemische	11
Plattform und Software	16
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	17
Kit-Inhalt	17
Zusätzlich benötigtes Material	18
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	20
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	21
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	23
Transportbedingungen	23
Lagerungsbedingungen	23
Haltbarkeit	23
Lagerung und Handhabung der Spezimen.....	25
Lagerung der Spezimen	28
Verfahren	30
Extraktion von DNA aus FFPE-Spezimen	30
Extraktion von DNA aus Plasmaspezimen.....	32
Nachweis von <i>PIK3CA</i> -Mutationen	33
Durchführung eines <i>PIK3CA</i> -Mutationsanalyselaufs.....	39

Ergebnisse	53
Auswertung	53
Statusindikatoren im <i>therascreen</i> PIK3CA Assay-Profil des Rotor-Gene AssayManager v2.1	55
Leistungsmerkmale: Gewebespezimen.....	59
Analytische Leistung: Gewebespezimen	59
Leerwertgrenze (LoB): Gewebespezimen	59
Nachweisgrenze (LoD): Gewebespezimen	60
Ausgangsmengen genomischer DNA: Gewebespezimen	61
ΔC_T -Cut-off-Werte: Gewebespezimen	62
Auswirkung der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_T -Werte (Linearität): Gewebespezimen	63
Assayspezifität (Kreuzreaktivität/Spezifität): Gewebespezimen.....	64
Störungen: Gewebespezimen	65
Austauschbarkeit der Chargen: Gewebespezimen.....	67
Handhabung der Spezimen: Gewebespezimen	67
Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit: Gewebespezimen.....	68
Kreuzkontaminationen/analytische Verschleppung: Gewebespezimen.....	72
Genauigkeit: Vergleich mit der analytischen Referenzmethode (Gewebespezimen)	73
Klinische Leistungsmerkmale: Gewebespezimen	75
Leistungsmerkmale: Plasmaspezimen	81
Analytische Leistung: Plasmaspezimen	81
Leerwertgrenze (LoB): Plasmaspezimen	81
Nachweisgrenze (LoD): Plasmaspezimen.....	82

Ausgangsmengen genomischer DNA: Plasmaspezimen	83
ΔC_T -Cut-off-Werte: Plasmaspezimen	84
Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_T -Werte (Linearität): Plasmaspezimen ...	85
Assay-Spezifität (Kreuzreaktivität/Spezifität): Plasmaspezimen	85
Störungen: Plasmaspezimen	86
Austauschbarkeit der Chargen: Plasmaspezimen	87
Handhabung der Spezimen: Plasmaspezimen.....	87
Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit: Plasmaspezimen	88
Validierung von Blutentnahmeröhrchen	92
Genauigkeit: Vergleich mit einer analytischen Referenzmethode (Plasmaspezimen)	93
Klinische Leistungsmerkmale: Plasmaspezimen	94
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	100
Literatur	103
Kontakt.....	103
Symbole	104
Bestellinformationen	106
Bearbeitungshistorie des Dokuments.....	108

Verwendungszweck

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist ein qualitativer real-time PCR-Test zum Nachweis von 11 Mutationen im Gen für die katalytische Untereinheit alpha der Phosphatidylinositol-3-Kinase (*PIK3CA*) (Exon 7: C420R; Exon 9: E542K, E545A, E545D [nur 1635G>T], E545G, E545K, Q546E, Q546R; Exon 20: H1047L, H1047R, H1047Y) unter Verwendung von genomischer DNA (gDNA), die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) Brustkrebsgewebe extrahiert wurde, oder von zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) aus Plasma, das aus mit K₂EDTA antikoaguliertem peripheren Vollblut von Patienten mit Brustkrebs gewonnen wurde.

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist für die Verwendung als begleitdiagnostischer Test vorgesehen und soll den Arzt bei der Identifizierung von Brustkrebspatienten unterstützen, die, abhängig vom Ergebnis eines Tests auf Mutationen im *PIK3CA*-Gen, für eine Behandlung mit PIQRAY® (Alpelisib) infrage kommen. Patienten, deren FFPE-Gewebe- oder Plasmaspezimen beim Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit in Bezug auf das Vorliegen von einer oder mehreren *PIK3CA*-Mutationen ein positives Resultat ergeben, sind für die Behandlung mit PIQRAY (Alpelisib) geeignet. Bei Patienten, deren Plasmaspezimen bei diesem Test zu einem negativen Resultat führt, sollte mit einem FFPE-Tumorgewebespezimen ein Bestätigungstest auf das Vorliegen von *PIK3CA*-Mutationen durchgeführt werden.

FFPE-Tumorgewebespezimen werden mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit für die manuelle Probenvorbereitung verarbeitet. Spezimen von mit K₂EDTA antikoaguliertem peripherem venösem Vollblut werden mit dem QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit für die manuelle Probenherstellung verarbeitet. Bei beiden Arten von Spezimen wird das Rotor-Gene Q (RGQ) MDx 5plex HRM Instrument zur automatischen Amplifikation und Detektion verwendet.

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist ein In-vitro-Diagnostikum.

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung verwendet werden.

Einschränkungen des Verfahrens

- Diese Gebrauchsanweisung muss vor der Verwendung des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits vollständig gelesen und verstanden werden.
- Zur Auswertung der mit dem Produkt erhaltenen Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen und labortechnischen Daten berücksichtigt werden. Die Ergebnisse dürfen nicht alleine für die Diagnose verwendet werden.
- Proben, für die das Ergebnis „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) angegeben wird, können *PIK3CA*-Mutationen enthalten, die vom *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit nicht erkannt werden.
- Daten zu analytischen und klinischen Leistungsmerkmalen in Bezug auf den Nachweis der folgenden *PIK3CA*-Mutationen: E545A, E545D, Q546E, Q546R und H1047Y wurden nur anhand von künstlichen Plasmaspezimen (mit Zelllinien-DNA versetztes Plasma) erfasst, nicht anhand von klinischen Spezimen der vorgesehenen Zielpopulation.
- Ob Mutationen nachgewiesen werden, hängt von der Qualität der Proben und der vorhandenen Menge an amplifizierbarer DNA ab. Das Testverfahren sollte wiederholt werden, wenn die Analyse der DNA in der Probe darauf hinweist, dass die Menge und/oder die Qualität entweder nicht ausreicht oder dass die Konzentration für die Mutationsanalyse zu hoch ist.
- Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wird im Rahmen eines PCR-Verfahrens eingesetzt. Wie bei allen PCR-Verfahren können Proben durch externe DNA-Quellen in der Testumgebung und DNA aus der Positivkontrolle kontaminiert werden. Beachten Sie daher alle Vorsichtsmaßnahmen, um eine Kontamination der Proben und Kit-Reagenzien zu vermeiden.
- Wenn die Probe weniger als den Prozentsatz mutierter Allele enthält, die mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit nachgewiesen werden können, führt dies zu dem Ergebnis „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen).
- Es ist nicht bekannt, ob das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit Kreuzreaktivität (die zu dem Ergebnis „Mutation Detected“ (Mutation nachgewiesen) führt) mit weiteren *PIK3CA*-

Mutationen außer den mit dem Kit nachweisbaren und als Biomarker aufgelisteten Mutationen zeigt.

- Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist ein qualitativer Test. Der Test liefert keine quantitativen Ergebnisse zur Häufigkeit der mutierten Allele (Mutant Allele Frequency, MAF) in einer Probe.
- Es ist nicht bekannt, welche Auswirkungen während des Assay-Verfahrens eingeschleppte Kontaminationen auf die Leistungsfähigkeit des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit haben. Anwender müssen mit der gebotenen Vorsicht vorgehen, um das Einführen mikrobieller Kontaminanten während der Testverfahren zu vermeiden, und sollten Kit-Komponenten, die Anzeichen für Mikrobenwachstum zeigen, nicht verwenden.
- Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist ausschließlich für die Verwendung mit DNA bestimmt, die aus FFPE-Brustkrebsgewebe- oder aus mit K₂EDTA antikoaguliertem, peripherem venösem Vollblut von Brustkrebspatienten gewonnenen Plasmaspezimen präpariert wurde.
- Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist ausschließlich für die Verwendung mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (für Gewebespezimen) und dem QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (für Plasmaspezimen) bestimmt.
- Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit kann nur mit allen Reaktionsgemischen verwendet werden.
- Das Produkt darf nur von Personen verwendet werden, die für die Anwendung in-vitro-diagnostischer Verfahren und die Bedienung des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments speziell eingewiesen und geschult wurden.
- Das Produkt ist ausschließlich für die Verwendung mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR Cyclers vorgesehen. Ein anderer Thermocycler mit optischer Echtzeit-Detektion kann mit diesem Produkt zusammen nicht verwendet werden.
- Zur Gewährleistung optimaler Ergebnisse müssen die Anweisungen in der *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit Gebrauchsanweisung (Handbuch)* genau befolgt werden. Die Verdünnung der Reagenzien ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führt.

-
- Dieses Handbuch ist zur Verwendung mit der Rotor-Gene AssayManager Software, Version 2.1, mit automatischer Angabe des Mutationsstatus bestimmt.
 - Achten Sie auf die Verfallsdaten und Lagerbedingungen, die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten des Kits aufgedruckt sind. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase- (PI3K-) Signalweg reguliert verschiedene zelluläre Funktionen wie die Zellproliferation, das Überleben von Zellen, die Proteinsynthese auf Ebene der Translation, den Glucosemetabolismus, die Zellmigration und die Angiogenese (1). In Tumorgeweben identifizierte aktivierende somatische Missense-Mutationen des *PIK3CA*-Gens (Gen für die katalytische Untereinheit alpha der Phosphatidylinositol-3-Kinase), die die Kinaseaktivität des PI3K α -Proteins erhöhen, wurden bei einer Vielzahl menschlicher Krebsarten mit zellulärer Transformation in Zusammenhang gebracht (2), darunter auch das hormonrezeptor-positive (HR+) Mammakarzinom (3).

Das Mammakarzinom ist die bei Frauen am häufigsten diagnostizierte Krebsart und die zweithäufigste Ursache für krebsbedingte Todesfälle (4). Es wurde geschätzt, dass im Jahr 2018 bei 266.120 Frauen in den USA Mammakarzinome diagnostiziert (entspricht etwa 30 % aller Krebserkrankungen bei Frauen) und 40.920 Todesfälle registriert werden dürften (5). Für Europa wurde prognostiziert, dass im gleichen Jahr 92.700 Frauen an Brustkrebs sterben würden (6). Brustkrebs bei Männern ist selten und macht < 1 % der diagnostizierten Krebsarten bei männlichen Patienten aus (4), die Behandlungsempfehlungen sind jedoch für beide Geschlechter dieselben.

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist ein qualitativer in-vitro-diagnostischer real-time PCR-Test, der auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument durchgeführt wird. Dabei werden ARMS- (allele refractory mutation system)-Primer, Hydrolysesonden und PCR-Clamp-Technik eingesetzt, um 11 Mutationen (Tabelle 1) in den Exons 7, 9 und 20 des *PIK3CA*-Onkogens vor dem Hintergrund von Wildtyp- (WT)-DNA nachzuweisen.

Tabelle 1. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit Assay-Ziele

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basenaustausch
7	C420R	757	1258 T>C
9	E542K	760	1624 G>A
	E545A	12458	1634 A>C
	E545D	765	1635 G>T
	E545G	764	1634 A>G
	E545K	763	1633 G>A
	Q546E	6147	1636 C>G
	Q546R	12459	1637 A>G
20	H1047L	776	3140 A>T
	H1047R	775	3140 A>G
	H1047Y	774	3139 C>T

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

Verfahrensprinzip

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit umfasst sechs verschiedene PCR-Amplifikations-Reaktionsgemische:

- fünf mutationsspezifische Reaktionen, die auf Exon 7, 9 und 20 des *PIK3CA*-Gens abgezielt sind
- eine Kontrollreaktion, die auf Exon 15 abgezielt ist

Die Hauptbestandteile des Kits sind im Folgenden beschrieben.

Mutationsreaktionsgemische

Mutierte DNA wird mithilfe mutationsspezifischer Reaktionsgemische unter Verwendung von mutationsspezifischen ARMS-Primern, Sonden (Hydrolysesonden und kurzen hochspezifische Sonden) und PCR-Clamps selektiv amplifiziert und nachgewiesen. Die Amplifikation mutierter DNA wird in den Kanälen Green, Yellow und Crimson des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments nachgewiesen.

ARMS

Allelspezifische Amplifikation wird mit Hilfe der ARMS-Methode erreicht, die auf der Fähigkeit der *Taq*-DNA-Polymerase beruht, zwischen einer übereinstimmenden und einer nicht übereinstimmenden Base am 3'-Ende eines PCR-Primers zu unterscheiden. Wenn der Primer vollständig übereinstimmt, erfolgt die Amplifikation mit voller Effizienz. Wenn die 3'-Base nicht übereinstimmt, erfolgt höchstens eine Hintergrund-Amplifikation auf niedrigem Niveau. Daher wird eine mutierte Sequenz selbst in Proben, bei denen der Großteil der DNA nicht mutiert ist, selektiv amplifiziert (Abbildung 1).

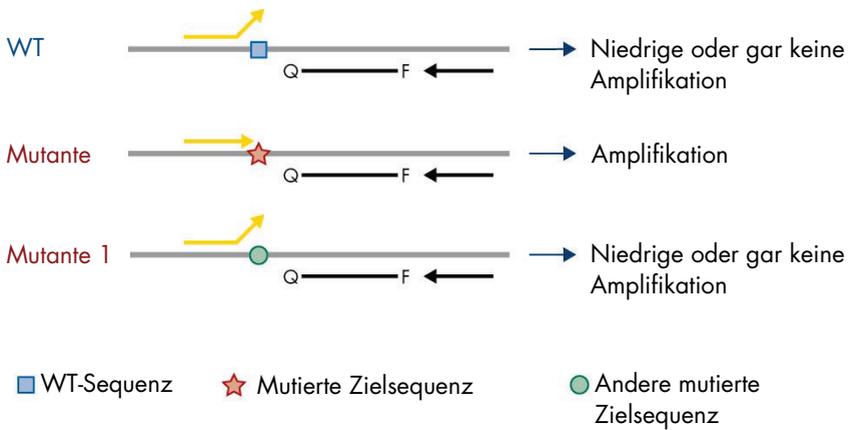


Abbildung 1. Spezifische Identifizierung einer Mutation durch ARMS-PCR. WT: Wildtyp. Q–F: mit zwei Farbstoffen markierte Sonde. ⇄: Forward- und Reverse-Primer.

Hydrolysesonden

Hydrolysesonden lagern sich an eine DNA-Region an, die von einem spezifischen Primer-Set amplifiziert wird. Während die *Taq*-Polymerase den Primer verlängert und den neuen DNA-Strang synthetisiert, wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase abgebaut. Dies führt zur Freisetzung des Fluorophors und zur Emission von Fluoreszenzlicht.

Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals ist nur dann nachweisbar, wenn die Zielsequenz zu den Primern und zur Sonde komplementär ist und somit bei der PCR amplifiziert wird (Abbildung 2).

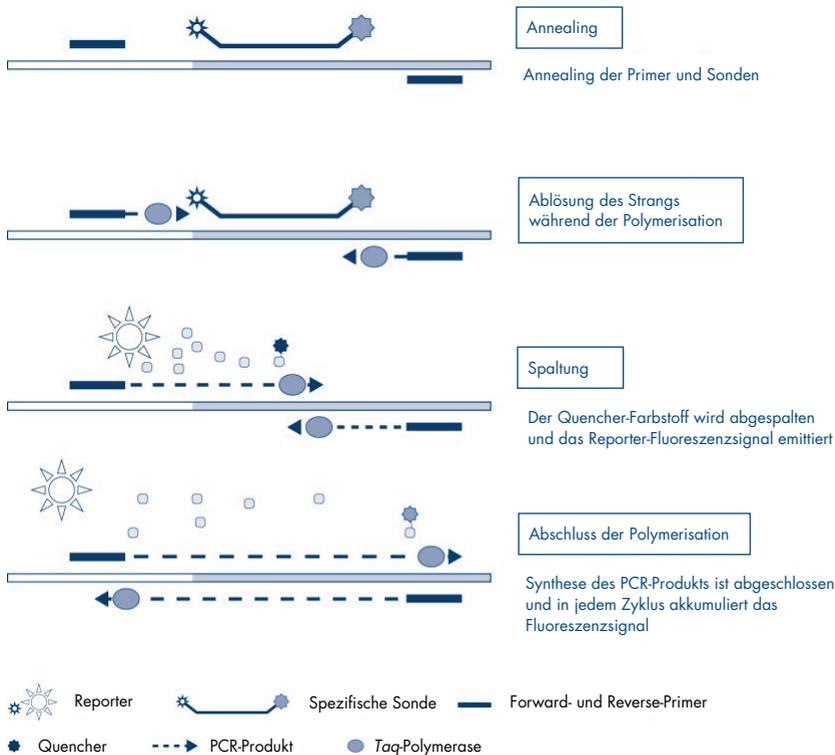
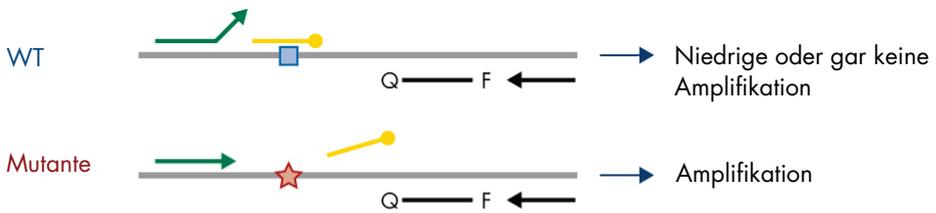


Abbildung 2. Reaktionsprinzip bei Verwendung von Hydrolysesonden.

PCR-Clamp

PCR-Clamps ermöglichen die selektive Amplifikation von mutierten Allelen. PCR-Clamps, die mit der Wildtyp-Sequenz perfekt übereinstimmen, binden an das Wildtyp-Template und verhindern die Amplifikation durch Interferenz mit der Primer-Verlängerung. Das 3'-Ende der PCR-Clamp ist durch Addition einer Phosphatgruppe blockiert, die die Verlängerung der Wildtyp-Sequenz stört (Abbildung 3).



- WT-Sequenz ★ Mutierte Zielsequenz
- 3'-Phosphat-Oligonukleotid (CLAMP)

Abbildung 3. PCR-Clamp-Methode. WT: Wildtyp. Q-F: mit zwei Farbstoffen markierte Sonde. ⇄: Forward- und Reverse-Primer.

Kontrollreaktion

Das Gemisch für die Kontrollreaktion (Röhrchen 1) enthält den Forward- und Reverse-Primer und eine markierte Sonde (detektiert im Kanal Green) für die Amplifikation einer kurzen Sequenz in Exon 15 des *PIK3CA*-Gens. Anhand der Kontrollreaktion wird geprüft, ob in der Probe eine ausreichende Konzentration von amplifizierbarer DNA vorhanden ist und in den analytischen Berechnungen zur Bestimmung des Mutationsstatus einen Faktor darstellt.

Interne Kontrolle

Jedes der Reaktionsgemische enthält eine interne Kontrolle, mit der eine eventuelle Störung der Reaktion festgestellt werden soll (z. B. durch das Vorhandensein von Inhibitoren). Die interne Kontrolle nutzt eine mit *PIK3CA* nicht verwandte Oligonukleotid-Zielsequenz, nicht markierte Forward- und Reverse-Primer und eine Hydrolysesonde, die mit einem Fluorophor markiert ist, das orangefarbenes Licht emittiert.

Positivkontrolle

Die positive Kontrolle (Röhrchen PC (Positive control)) enthält ein Gemisch von fünf Plasmiden, die alle 11 Mutationen sowie die Kontrolle repräsentieren. Durch den Nachweis der

Mutationen in akzeptablem Umfang wird bestätigt, dass die verschiedenen Reaktionsgemische im Kit einwandfrei funktionieren.

Negativkontrolle

Die Nicht-Template-Kontrolle (Röhrchen-NTC) enthält nukleasefreies Wasser, das für die Reaktion „Nicht-Template-Kontrolle“ (No Template Control, NTC) erforderlich ist. Die Kontrolle ohne Template dient als Negativkontrolle und wird bei der Assay-Konfiguration zur Erkennung möglicher Kontaminationen eingesetzt.

Probenverdünnungslösung

Die Probenverdünnungslösung (Röhrchen Dil.) enthält nukleasefreies Wasser.

Plattform und Software

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist speziell für die Verwendung mit dem Rotor-Gene Q MDx Thermocycler bestimmt, der über einen Personal Computer bedient wird, auf dem folgende Software installiert ist:

- Rotor-Gene AssayManager® Version 2.1
- Gamma Plug-in Version 1.0.0
- *therascreen*_PIK3CA_FFPE Assay Profile Version 1.0.1 für die Analyse von Gewebespezimen
- *therascreen*_PIK3CA_Plasma Assay Profile Version 1.0.1 für die Analyse von Plasmaspezimen

Informationen über das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument finden Sie im *Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Handbuch*. Das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument muss gemäß den Anweisungen im Handbuch für das Gerät gewartet werden.

Weitere Informationen über die Software erhalten Sie im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application Handbuch* und im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in Handbuch*.

Laufparameter

Die verschiedenen Zyklusparameter (oder „Testläufe“) für das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument werden mit *therascreen* PIK3CA Assay Profiles programmiert. Diese Assay-Profile enthalten die PCR-Testlaufparameter und dienen zur Berechnung der Ergebnisse. Für den Assay werden folgende Zyklusparameter verwendet:

- Halten einer Temperatur von 95 °C für 15 Minuten, um die *Taq*-DNA-Polymerase zu aktivieren.
- PCR über 45 Zyklen bei 95 °C für 30 Sekunden zur Denaturierung und bei 60 °C für 1 Minute zum Annealing und zur Verlängerung.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit (24)		
Katalog-Nr.		873111
Anzahl der Reaktionen		24
Inhalt	Farbe der Schutzkappe	Volumen
PIK3CA Reaction Mix 1 (PIK3CA Reaktionsgemisch 1)	Rot	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 2 (PIK3CA Reaktionsgemisch 2)	Lila	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 3 (PIK3CA Reaktionsgemisch 3)	Orange	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 4 (PIK3CA Reaktionsgemisch 4)	Gelb	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 5 (PIK3CA Reaktionsgemisch 5)	Grün	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 6 (PIK3CA Reaktionsgemisch 6)	Blau	750 µl
Taq DNA Polymerase (Taq) (Taq-DNA-Polymerase (Taq))	Mintgrün	85 µl
PIK3CA Positive Control (PC) (PIK3CA Positive Kontrolle (PC))	Beige	250 µl
Water for No Template Control (NTC) (Wasser für Nicht-Template-Kontrolle)	Weiß	1,9 ml
Nuclease-free water for Dilution (Dil.) (Nukleasefreies Wasser zur Verdünnung (Verd.))	Weiß	1,9 ml
therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit Gebrauchsanweisung (Handbuch)		1

Zusätzlich benötigtes Material

Stellen Sie vor dem Gebrauch sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

Reagenzien

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 60404, siehe „Extraktion von DNA aus FFPE-Spezimen“, Seite 30) oder QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 61504, siehe „Extraktion von DNA aus Plasmaspezimen“, Seite 32)
- DNAZap™ PCR-Degradierlösungen
- Distel High Level Labordeinfektionsmittel und Isopropylalkohol- (IPA)-Waschlösung

Verbrauchsmaterialien

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps zur Verwendung mit einem 72-Well-Rotor (QIAGEN, Kat.-Nr. 981103 oder 981106)
- Nukleasefreie, DNA-bindungsarme Mikrozentrifugenröhrchen zur Herstellung von Master-Mixes
- Nukleasefreie Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern

Ausstattung/Geräte

- Wasserfester Filzstift
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (Kat.-Nr. 9002032) oder Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (Kat.-Nr. 9002033)*†

* Stellen Sie sicher, dass Geräte und Ausrüstung gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

† In einigen Ländern kann ggf. das Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument mit Produktionsdatum ab Mai 2011 verwendet werden. Das Herstellungsdatum kann der Seriennummer auf der Rückseite des Geräts entnommen werden. Die Seriennummer hat das Format „mmjjnnn“, wobei „mm“ für den Produktionsmonat in Ziffern, „jj“ für die letzten beiden Ziffern des Produktionsjahres und „nnn“ für die eindeutige Geräteerkennung steht.

- Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in und „therascreen_PIK3CA_FFPE“ und/oder „therascreen_PIK3CA_Plasma“ Assay Profile
- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Probenvorbereitung
- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Herstellung des PCR-Master-Mix
- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Dispensierung von Template-DNA
- Tischzentrifuge* mit Rotor für 1,5-ml-Röhrchen
- Thermomixer*, beheizter Orbitalinkubator, Wärmeblock* oder Wasserbad* zur Inkubation bei 56 °C, 70 °C und 90 °C
- QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold (Kat.-Nr. 19413)
- QIAvac Connecting System (Kat.-Nr. 19419)
- Vacuum Pump (Kat.-Nr. 84010) oder gleichwertige Pumpe zur Erzeugung eines Vakuums von -800 bis -900 mbar
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionskonfiguration (QIAGEN, Kat.-Nr. 9018901)
- Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes, Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionskonfiguration mit einer Einkanalpipette in 96 x 0.2 ml PCR Tubes (QIAGEN, Katalog-Nr. 9018905)
- 72-Well Rotor für Strip Tubes and Caps, 0.1 ml mit Reaktionsvolumen von 10–50 µl; erfordern einen Locking Ring 72-Well Rotor (QIAGEN, Kat.-Nr. 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor, für Strip Tubes and Caps, 0.1 ml im 72-Well Rotor (QIAGEN, Kat.-Nr. 9018904)

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung verwendet werden.

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN-Kit und jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Zur ausschließlichen Verwendung mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument.

Sicherheitshinweise zum Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument finden Sie im zugehörigen Benutzerhandbuch.

Nur Gewebespezimen: Zur ausschließlichen Verwendung mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Sicherheitshinweise zum QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Katalog-Nr. 60404) finden Sie im *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbuch*.

Nur Plasmaspezimen: Zur ausschließlichen Verwendung mit dem QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit.

Sicherheitshinweise zum QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (Kat.-Nr. 61504) finden Sie im *QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit Handbuch*.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

- Der Test ist für die Verwendung mit FFPE-Brustkrebs-Gewebespezimen oder K₂EDTA Plasmaspezimen von Brustkrebspatienten vorgesehen.
- Alle chemischen und biologischen Materialien sind potenziell gefährlich. Es ist unwahrscheinlich, dass Material aus FFPE-Spezimen und daraus präparierte Nukleinsäuren ein Infektionsrisiko darstellen, jedoch sollten alle Plasmaspezimen als potenziell gefährlich behandelt werden. Lokale institutionelle Gesundheits- und Sicherheitsverfahren müssen stets eingehalten werden.
- Spezimen-, Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den lokalen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.
- Die Reagenzien im *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit sind optimal verdünnt. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien wird nicht empfohlen, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann. Eine Verwendung von Reaktionsvolumina (Reaktionsgemisch plus Probe) unter 25 µl wird nicht empfohlen.
- Alle im *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus demselben *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit vorgesehen. Die im *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien dürfen nicht durch andere Reagenzien oder durch Reagenzien aus anderen *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits ersetzt werden, da dies die Leistungsfähigkeit beeinträchtigen kann.
- Verwenden Sie ausschließlich die im *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit mitgelieferte *Taq*-DNA-Polymerase (Röhrchen *Taq*). Diese darf nicht durch die *Taq*-DNA-Polymerase aus anderen QIAGEN Kits oder durch *Taq*-DNA-Polymerase anderer Hersteller ersetzt werden.
- Weitere Informationen zu Warnhinweisen, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren finden Sie im Benutzerhandbuch des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments.
- Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination der Kontroll- und Reaktionsgemisch-Reagenzien mit synthetischem Material zu vermeiden, das im Positivkontrollreagenz enthalten ist.

-
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um Kreuzkontamination zwischen Proben zu verhindern. Verschließen Sie die Röhrchen sofort nach dem Hinzufügen der einzelnen Proben.
 - Dekontaminieren Sie den Ladeblock gründlich, bevor er zur Vorbereitung der Assay-Master-Mixes benutzt wird. Es wird empfohlen, DNAZap PCR-Degradierungslösungen, gefolgt von Distel High Level Labordesinfektionsmittel und IPA-Waschlösung zu verwenden. Der Ladeblock muss vor Gebrauch trocknen.
 - Verwenden Sie für die Vorbereitung der Reaktionsgemische und die Zugabe von Positivkontrollreagenzien speziell dafür reservierte Pipetten.
 - Führen Sie die Vorbereitung und Dispensierung der Reaktionsgemische in einem Bereich durch, der von dem Bereich, in dem die Positivkontrolle zugegeben wird, physisch getrennt ist.
 - In den Reaktionsgemischen enthaltene fluoreszenzmarkierte Moleküle sind lichtempfindlich. Kontroll- und Reaktionsgemisch-Reagenzien müssen vor Licht geschützt werden, um Photobleichung zu vermeiden.
 - Öffnen Sie das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument erst, wenn der Testlauf beendet ist.
 - Rotor-Gene Q Röhrchen dürfen nach dem Testlauf nicht geöffnet werden.
 - Es müssen alle Vorsichtsmaßnahmen zur Sicherstellung einer korrekten Analyse der Proben ergriffen werden, um falsches Einsetzen der Proben, Beladungsfehler und Pipettierfehler zu vermeiden.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Transportbedingungen

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wird auf Trockeneis versandt und muss beim Empfang gefroren sein. Wenn Bestandteile des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit beim Empfang nicht gefroren sind, die Umverpackung während des Transports geöffnet wurde oder die Lieferung keine Stückliste, keine Gebrauchsanweisung oder keine Reagenzien enthält, wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort (Kontaktangaben siehe www.qiagen.com).

Lagerungsbedingungen

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit muss unmittelbar nach dem Empfang lichtgeschützt bei -30 bis -15°C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden.

Bei Lagerung unter den angegebenen Lagerungsbedingungen ist das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bis zum Ablauf des angegebenen Verfallsdatums stabil.

Haltbarkeit

Nach dem Öffnen können die Reagenzien in der Originalverpackung für 12 Monate oder bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei -30 bis -15°C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Es dürfen maximal fünf Einfrier-/Auftauzyklen durchgeführt werden.

Die Reagenzien müssen vor Gebrauch über einen Zeitraum von mindestens 1 Stunde (bis maximal 4,5 Stunden) bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Wenn die Reagenzien in einem gebrauchsfertigen Zustand sind, können die PCR-Reaktionen eingerichtet werden. Die Rotor-Gene Q Röhrchen, die die Master-Mixe und die Proben-DNA enthalten, sollten sofort in den

Rotor-Gene Q MDx Thermocycler geladen werden. Der Gesamtzeitraum vom Beginn der PCR-Konfiguration bis zum Beginn des Laufs sollte, wenn sie bei Raumtemperatur durchgeführt wird, 7,5 Stunden nicht überschreiten.

Hinweis: Diese Zeit umfasst sowohl die PCR-Konfiguration als auch die Lagerung.

Hinweis: In den Reaktionsgemischen enthaltene fluoreszenzmarkierte Moleküle sind lichtempfindlich. Kontroll- und Reaktionsgemisch-Reagenzien müssen vor Licht geschützt werden, um Photobleichung zu vermeiden.

Die Reagenzien im *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit sind optimal verdünnt und müssen vor dem Gebrauch nicht weiter gereinigt oder vorbehandelt werden.

Achten Sie auf die Verfallsdaten und Lagerbedingungen, die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten aufgedruckt sind. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Lagerung und Handhabung der Spezimen

Handhabung der Spezimen: Gewebe

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist zur Verwendung mit gDNA bestimmt, die aus resezierten FFPE-Tumorgewebespezimen und Stanzbiopsiespezimen von Brustkrebspatienten extrahiert wurde. Tumore sind sowohl hinsichtlich des Genotyps als auch hinsichtlich des Phänotyps heterogen. So wie mutationspositive Tumore Wildtyp-DNA-enthalten können, können histologisch betrachtet auch Regionen mit nicht tumorösem Gewebe vorkommen.

So bereiten Sie Gewebespezimen für die DNA-Extraktion vor:

- Fixieren Sie die Gewebespezimen unter Verwendung von Standardmaterialien und -methoden in 10 % neutralgepuffertem Formalin (neutral buffered formalin, NBF) und betten Sie die Gewebespezimen in Paraffin ein. Schneiden Sie mit einem Mikrotom 5- μ m-Serienschnitte von einem Paraffinblock ab und ziehen Sie diese auf einen Objektträger aus Glas auf.
- Lassen Sie einen mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbten Schnitt von einem Spezialisten (z. B. Pathologen) auf Tumorgehalt und effektive Tumorphäche (effective tumor area, ETA) untersuchen. Markieren Sie den gefärbten Objektträger, um den interessierenden Bereich (region of interest, ROI) festzulegen. Verwenden Sie für die DNA-Extraktion Serienschnitte.

Hinweis: Die eingefärbten Schnitte dürfen nicht für die DNA-Extraktion verwendet werden.

- Entfernen Sie mit einem frischen sterilen Skalpell überschüssiges Paraffin von den Gewebeabschnitten und entsorgen Sie es.

VORSICHT



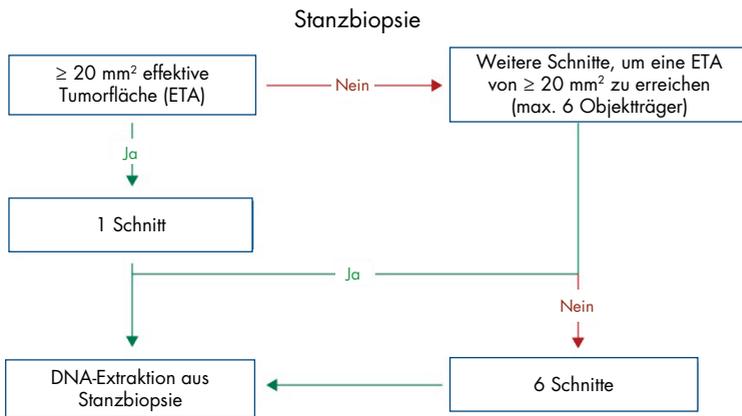
Verwenden Sie trockene Skalpelle. Dieser Schritt darf nicht in einer Laminar-Flow-Sterilbank oder einem Abzug durchgeführt werden.

-
- Kratzen Sie das Tumorgewebe von den Objektträgern in gekennzeichnete Mikrozentrifugenröhrchen und verwenden Sie für jedes Spezimen ein frisches Skalpell.

Kennzeichnen, handhaben und lagern Sie Tumorspezimen, Blöcke, Objektträger, Proben und Mikrozentrifugenröhrchen, die für die Extraktion bereit sind, auf kontrollierte Weise und unter Einhaltung der vor Ort geltenden Vorschriften.

Es gibt zwei unterschiedliche Workflows für die Verwendung von resezierten FFPE-Tumorgewebespezimen und von FFPE-Stanzbiopsiespezimen (Abbildung 4).

A



B

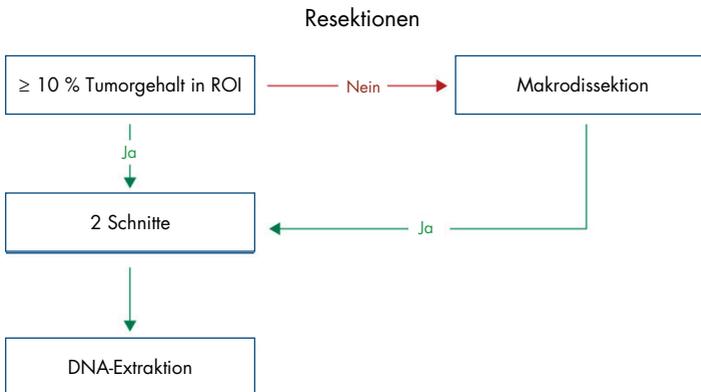


Abbildung 4. Workflow zur Reinigung klinischer Spezimen bei Verwendung des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.
A: FFPE-Stanzbiopsie. B: Resezierte FFPE-Tumorgewebespezimen.

Handhabung der Spezimen: Plasma

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist für die Verwendung mit DNA vorgesehen, die aus mit K₂-EDTA antikoagulierten Plasmaspezimen von Brustkrebspatienten isoliert wurde. Alle Plasmaspezimen sind als potenziell gefährlich zu behandeln.

Peripheres venöses Vollblut, das in K₂-EDTA Blutentnahmeröhrchen entnommen wurde, muss innerhalb von vier Stunden nach der Blutentnahme zur Plasmagewinnung verarbeitet werden. Anderenfalls kann dies eine Kontamination der Probe mit genomischer DNA zur Folge haben. Weitere Informationen zur Isolierung von Plasma aus Vollblut finden Sie in Anhang A des *QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit Handbuchs*.

Plasmaspezimen sollten bei –80 °C gelagert werden. Gefrorene Plasmaspezimen müssen vor Gebrauch stets auf Raumtemperatur äquilibriert werden.

Kennzeichnen, handhaben und lagern Sie Spezimen, Proben und Mikrozentrifugenröhrchen, die für die Extraktion bereit sind, auf kontrollierte Weise und unter Einhaltung der geltenden Vorschriften.

Lagerung der Spezimen

Vor der DNA-Extraktion sind FFPE-Blöcke und Objektträger bei Raumtemperatur (15–25 °C) und Plasma bei –80 °C aufzubewahren. Eine Lagerung der DNA nach der Extraktion und vor der Durchführung von Tests kann ebenfalls erforderlich sein. Tabelle 2 und Tabelle 3 bieten einen Überblick über die maximal empfohlenen Lagerzeiten und -bedingungen für Spezimen und DNA nach der Extraktion.

Tabelle 2. Empfohlene Lagerzeiten für aus FFPE-Gewebe extrahierte gDNA

Lagerung	Maximal empfohlene Lagerzeit
Gefrierschrank (-30 bis -15 °C)	5 Wochen
Kühlschrank (2-8 °C)	1 Woche
Gefrierschrank (-80 °C)	33 Monate

Tabelle 3. Empfohlene Lagerbedingungen und -zeiten für Plasma und aus Plasma extrahierte ctDNA

Spezimen	Lagerung	Maximal empfohlene Lagerzeit
Plasma	Gefrierschrank (-80 °C)	11 Monate
Extrahierte ctDNA	Gefrierschrank (-30 bis -15 °C)	4 Wochen

Verfahren

Extraktion von DNA aus FFPE-Spezimen

Die DNA-Extraktion sollte mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Kat.-Nr. 60404) durchgeführt werden.

Hinweis: Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wurde unter Verwendung von DNA entwickelt, die mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit extrahiert wurde. Verwenden Sie kein anderes Produkt zur DNA-Extraktion.

Führen Sie die DNA-Extraktion gemäß den Anweisungen im *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* durch und beachten Sie dabei Folgendes:

- Arbeiten Sie mit den in den nachstehenden Abschnitten („FFPE-Spezimen aus Geweberesektion (RES)“ und „FFPE-Spezimen aus Stanzbiopsie“ auf Seite 31 dieses Handbuchs) empfohlenen Anzahlen von Objektträgern und Elutionsvolumina.
- Wenn das Gewebe nach der ersten Zentrifugation noch nicht pelletiert ist, führen Sie eine weitere Zentrifugation durch.
- Es muss für alle erforderlichen Schritte Ethanol* in Molekularbiologie-Qualität verwendet werden.
- Inkubieren Sie das offene Röhrchen nach Entfernung des Ethanols 10 Minuten lang bei 15–40 °C, bis alle Ethanolrückstände verdunstet sind.

FFPE-Spezimen aus Geweberesektion (RES)

- Wenn der Tumorgehalt der RES-Spezimen in der Zielregion $\geq 10\%$ beträgt, sammeln Sie den gesamten Gewebebereich aus zwei Schnitten (4–5 μm) in beschrifteten Mikrozentrifugenröhrchen. Dabei ist für jedes Spezimen ein frisches Skalpell zu

* Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe wie z. B. Methanol oder Methylethylketon enthält.

verwenden. Wenn der Tumorgehalt der Spezimen in der Zielregion < 10 % beträgt, führen Sie eine Makrodissektion durch und sammeln Sie nur die Tumor-Zielregion aus zwei Schnitten in beschrifteten Mikrozentrifugenröhrchen. Auch hier ist für jedes Spezimen ein frisches Skalpell zu verwenden.

- Der Proteinase-K-Verdau muss für resezierte Gewebespezimen 1 Stunde lang durchgeführt werden.
- Für RES-Spezimen muss die aufgereinigte gDNA nach 10-minütiger Inkubation auf der Säule in 120 µl Buffer ATE (im QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit enthalten) eluiert werden.

FFPE-Spezimen aus Stanzbiopsie

- Für Stanzbiopsiespezimen ist eine angemessene Zahl Schnitte von je 4–5 µm zu verwenden, um aus maximal sechs Schnitten die minimal erforderliche effektive Tumorfläche (effective tumor area, ETA) von 20 mm² zu erhalten. Verwenden Sie nur so viele Schnitte (1–6), wie zum Erhalten von 20 mm² ETA unbedingt benötigt werden.
- Für Spezimen, bei denen eine ETA von 20 mm² mit dem Maximum von sechs Schnitten nicht erreicht werden kann, fahren Sie trotzdem mit sechs Schnitten fort.
- Der Proteinase-K-Verdau muss für Stanzbiopsiespezimen 1 Stunde lang durchgeführt werden.
- Für Stanzbiopsiespezimen muss die aufgereinigte genomische DNA nach 10-minütiger Inkubation auf der Säule in 70 µl Buffer ATE (im QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit enthalten) eluiert werden.

Extraktion von DNA aus Plasmaspezimen

Die DNA-Extraktion sollte mit dem QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (Kat.-Nr. 61504) unter Beachtung der nachstehend beschriebenen Vorgaben für die Aufreinigung von ctDNA aus Plasmaspezimen durchgeführt werden.

Hinweis: Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wurde unter Verwendung von DNA entwickelt, die mit dem QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit extrahiert wurde. Verwenden Sie kein anderes Produkt zur DNA-Extraktion.

Führen Sie die DNA-Extraktion gemäß den Anweisungen für das „Klassische Protokoll“ im *QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit Handbuch* durch und beachten Sie dabei Folgendes:

- Das Plasma-Anfangsvolumen beträgt 2 ml.
- Wenn keine 2 ml vorhanden sind, stellen Sie das Volumen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) auf 2 ml ein.
- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt werden.
- Schalten Sie das Vakuum zwischen den einzelnen Schritten aus, um sicherzustellen, dass für das gesamte Protokoll ein beständiges, gleichmäßiges Vakuum angelegt wird.
- Es wird ein Proteinase-K-Volumen von 250 µl benötigt.
- Die aufgereinigte ctDNA muss in 70 µl Buffer AVE (im QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit enthalten) eluiert werden.
- Das QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit darf nur manuell verwendet werden.
- Es muss für alle erforderlichen Schritte Ethanol* in Molekularbiologie-Qualität verwendet werden.
- Lagern Sie aufgereinigte ctDNA bei –30 bis –15 °C.

* Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe wie z. B. Methanol oder Methylethylketon enthält.

Hinweis: Alle Assays im *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit erzeugen kurze PCR-Produkte. Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit funktioniert jedoch nicht bei stark fragmentierter DNA. Damit eine Probe als gültig eingestuft wird, sollte der C_T-Wert der extrahierten DNA innerhalb des Arbeitsbereichs der Kontrolle ($\geq 24,68$ und $\leq 31,68$) liegen.

Nachweis von *PIK3CA*-Mutationen

Dieses Protokoll ist für den Nachweis von *PIK3CA*-Mutationen vorgesehen.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Mit dem in jedem Kit enthaltenen PIK3CA-Reaktionsgemisch können bis zu 24 Proben über vier Läufe untersucht werden. Optimal sind vier Läufe mit maximal sechs Proben pro Lauf. Bei kleineren Probenchargengrößen verringert sich die Anzahl der Proben, die mit einem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit getestet werden können.
- Für den Test einer Probe müssen alle im *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit vorhandenen Reaktionsgemische verwendet werden.
- Eine Analyse gemischter Chargen, die sowohl Gewebe- als auch Plasmaspezimen enthalten, im selben PCR-Lauf ist nicht möglich. Jeder PCR-Lauf darf nur entweder aus Gewebe oder aus Plasma gewonnene Proben enthalten.
- Mischen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (Röhrchen *Taq*) oder andere Gemische, die *Taq*-DNA-Polymerase enthalten, nicht im Vortexer, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.
- Pipettieren Sie die *Taq*-DNA-Polymerase, indem Sie die Pipettenspitze nur kurz vorsichtig unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass das Äußere der Spitze großflächig mit dem Enzym in Berührung kommt.

Vorbereitende Schritte

- Stellen Sie sicher, dass die Läufe unter Verwendung des Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma-Plugins und eines der Assay-Profile „*therascreen*_PIK3CA_FFPE“

(Gewebespezimen) oder „therascreen_PIK3CA_Plasma“ (Plasmaspezimen) durchgeführt werden. Vergewissern Sie sich vor der ersten Verwendung des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments, dass die erforderliche Software installiert ist und befolgen Sie die entsprechenden Anweisungen zu Beginn des Laufs und bei der Datenanalyse („Durchführung eines *PIK3CA*-Mutationsanalyselaufs“ auf Seite 39).

- Alle Reagenzien, einschließlich der *Taq*-DNA-Polymerase (Röhrchen *Taq*), sowie die DNA-Proben müssen vor dem Gebrauch 1 Stunde (und bis maximal 4,5 Stunden) lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig aufgetaut, durch 10-maliges Umschwenken gemischt und kurz zentrifugiert werden, damit sich der Inhalt unten im Röhrchen sammelt.
- Vergewissern Sie sich, dass der PCR-Ladeblock angemessen dekontaminiert wurde (siehe „Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen“, Seite 21) und trocken ist.

Verfahren

1. Tauen Sie alle Gemische, das Wasser für die Nicht-Template-Kontrolle, die *Taq*-DNA-Polymerase, die *PIK3CA* Positivkontrolle und die DNA-Proben mindestens 1 Stunde und maximal 4,5 Stunden lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) auf.
2. Mischen Sie nach 1 Stunde alle Reagenzien durch 10-maliges Umschwenken gründlich, um eine einheitliche Salzkonzentration zu gewährleisten. Zentrifugieren Sie alle Reagenzien kurz, damit sich der Inhalt am Boden der Röhrchen sammelt.

Hinweis: Mischen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (Röhrchen *Taq*) oder andere Gemische, die *Taq*-DNA-Polymerase enthalten, nicht im Vortexer, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.

3. Beschriften Sie sechs Mikrozentrifugenröhrchen (nicht enthalten) gemäß Tabelle 4. Setzen Sie gemäß den Volumenangaben in Tabelle 4 ausreichend Master-Mixe (Kontroll- und Mutationsreaktionsgemische) sowie *Taq*-DNA-Polymerase für die DNA-Proben, eine *PIK3CA* Positivkontrollreaktion und eine Nicht-Template-Kontrollreaktion an.

Die Master-Mixe enthalten mit Ausnahme der Probe alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Hinweis: Bei der Herstellung des Master-Mix wird zuerst das erforderliche Volumen an Kontroll- oder Mutationsreaktionsgemisch in das jeweilige Röhrchen gegeben; erst dann wird die Taq-DNA-Polymerase zugegeben.

Tabelle 4. Herstellung der Assay-Master-Mixe

Reaktionsgemischröhrchen	Volumen des Reaktionsgemisches (n* + 3)	Volumen der Taq-DNA-Polymerase (n* + 3)
Röhrchen RM 1	19,83 µl × (n + 3)	0,17 µl × (n + 3)
Röhrchen RM 2	19,83 µl × (n + 3)	0,17 µl × (n + 3)
Röhrchen RM 3	19,83 µl × (n + 3)	0,17 µl × (n + 3)
Röhrchen RM 4	19,83 µl × (n + 3)	0,17 µl × (n + 3)
Röhrchen RM 5	19,83 µl × (n + 3)	0,17 µl × (n + 3)
Röhrchen RM 6	19,83 µl × (n + 3)	0,17 µl × (n + 3)

* n = Anzahl der DNA-Proben. Der Wert n darf sechs nicht überschreiten, da sechs die maximale Anzahl von Proben ist, die in einem Testlauf verarbeitet werden kann. Drei zusätzliche Reaktionen sind enthalten, damit bei der PCR-Konfiguration und für die Kontrollen ausreichend Material zur Verfügung steht.

4. Verschließen Sie das Master-Mix-Röhrchen und mischen Sie den Master-Mix gründlich durch 10-maliges Umschwenken. Zentrifugieren Sie kurz, um sicherzustellen, dass sich das Gemisch am Boden des Röhrchens befindet.
5. Sobald die Master-Mixe fertig vorbereitet sind, stellen Sie die benötigte Anzahl von PCR-4-Röhrchenstreifen (jeder Streifen besteht aus vier Röhrchen; PCR-4-Röhrchenstreifen nicht enthalten) gemäß der Anordnung in Tabelle 4 in den Ladeblock. Verschließen Sie die Röhrchenstreifen nicht. Geben Sie sofort 20 µl des entsprechenden Master-Mix in jedes PCR-Röhrchen des Streifens.

Hinweis: Die Deckel verbleiben im Kunststoffbehälter, bis sie benötigt werden.

Hinweis: Die Röhrchenanordnung für die Konfiguration der Reaktionsgemische finden Sie in Tabelle 4.

Tabelle 5. Testlaufanordnung im Ladeblock für den Nachweis von PIK3CA-Mutationen

Assay	Kontrollen		Probennummer						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Röhrchen RM 1	1	9	17	25	33	41	49	57	E
Röhrchen RM 2	2	10	18	26	34	42	50	58	E
Röhrchen RM 3	3	11	19	27	35	43	51	59	E
Röhrchen RM 4	4	12	20	28	36	44	52	60	E
Röhrchen RM 5	5	13	21	29	37	45	53	61	E
Röhrchen RM 6	6	14	22	30	38	46	54	62	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

Hinweis: Jedes Röhrchen sollte ein Reaktionsvolumen von insgesamt 25 µl haben (20 µl Master-Mix gemäß Tabelle 4 und 5 µl NTC/Probe/PC). Die Zahlen stehen für die Positionen im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an. E: Empty (Leer).

6. Geben Sie sofort 5 µl Wasser für die Nicht-Template-Kontrolle in die NTC-Röhrchen (Röhrchenpositionen 9–14) und verschließen Sie die Röhrchen mit den Deckeln.
7. Geben Sie 5 µl jeder DNA-Probe in die jeweiligen Probenröhrchen und verschließen Sie diese anschließend sofort, um Kreuzkontaminationen von Probe zu Probe zu vermeiden.
8. Geben Sie 5 µl PIK3CA-Positivkontrolle in die PC-Röhrchen (Röhrchenpositionen 1–6) und verschließen Sie die Röhrchen mit den Deckeln.
9. Kennzeichnen Sie mit einem wasserfesten Filzstift die Deckel der ersten Röhrchen, die sich in jedem PCR-4-Röhrchenstreifen in der Position mit der niedrigsten Nummer befinden (z. B. Positionen 1, 5 und 9 usw.), um die Ausrichtung für das Laden der Röhrchen in den 72-Well-Rotor des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments anzuzeigen.
10. Setzen Sie alle PCR-4-Röhrchenstreifen entsprechend der Laufanordnung (Tabelle 5 und Abbildung 5) in die entsprechenden Positionen des 72-Well-Rotors ein. Achten Sie besonders darauf, dass die Röhrchen im 72-Well-Rotor an die korrekten Positionen gesetzt werden (Röhrchenposition im 72-Well-Rotor muss mit der Röhrchenposition im Ladeblock übereinstimmen).

Hinweis: Alle unbesetzten Positionen im Rotor müssen mit verschlossenen, leeren Röhrcchen bestückt werden. Dadurch wird gewährleistet, dass ein optimaler thermischer Wirkungsgrad des Rotor-Genes Q MDx 5plex HRM Instruments erreicht wird.

	PC	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Leer
PIK3CA-Reaktionsgemisch 1	1	9	17	25	33	41	49	57	65
PIK3CA-Reaktionsgemisch 2	2	10	18	26	34	42	50	58	66
PIK3CA-Reaktionsgemisch 3	3	11	19	27	35	43	51	59	67
PIK3CA-Reaktionsgemisch 4	4	12	20	28	36	44	52	60	68
PIK3CA-Reaktionsgemisch 5	5	13	21	29	37	45	53	61	69
PIK3CA-Reaktionsgemisch 6	6	14	22	30	38	46	54	62	70
Leer	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Leer	8	16	24	32	40	48	56	64	72

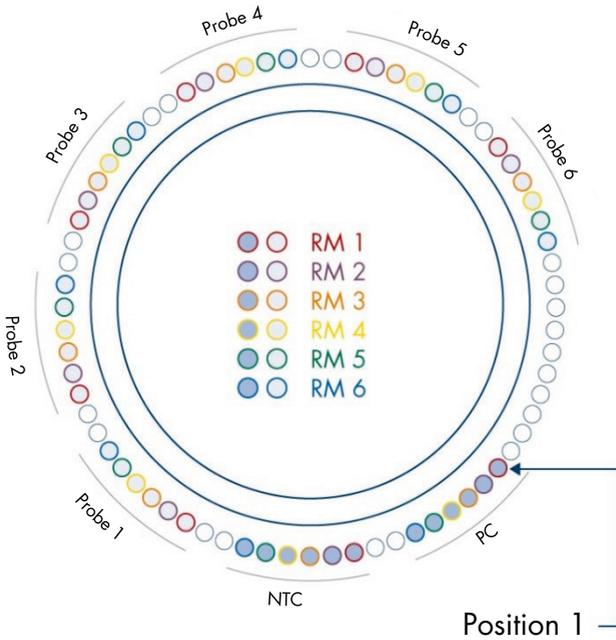


Abbildung 5. Platten- und Rotoreinrichtung für eine Analyse mit dem *therascreen* PIK3CA RGG PCR Kit.
 PC: Positivkontrolle. S: DNA-Probe (Sample). NTC: Nicht-Template-Kontrolle (Wasser).

VORSICHT



Die Röhrchen müssen wie in Abbildung 5 dargestellt in den Rotor eingesetzt werden, da die im Assay-Profil festgelegte automatisierte Analyse auf dieser Anordnung beruht. Wenn ein anderes Layout verwendet wird, werden abweichende Ergebnisse erhalten.

11. Setzen Sie den 72-Well-Rotor sofort in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument ein. Stellen Sie sicher, dass der Schliering (im Lieferumfang des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhrchen während des Testlaufs zu sichern, und vergewissern Sie sich, dass der Deckel des Instruments geschlossen ist.
12. Zum Starten des Laufs befolgen Sie die Anweisungen im nächsten Abschnitt, Durchführung eines *PIK3CA-Mutationsanalyselaufs*.

Durchführung eines *PIK3CA*-Mutationsanalyselaufs

13. Doppelklicken Sie auf dem Desktop des  Notebooks, das mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument verbunden ist, auf das Symbol des Rotor-Gene AssayManager v2.1.
14. Es erscheint automatisch die Umgebung „Setup“ (Einrichten). Klicken Sie auf die Schaltfläche „New manual worklist“ (Neue manuelle Arbeitsliste), um eine neue Arbeitsliste zu erstellen (Abbildung 6).

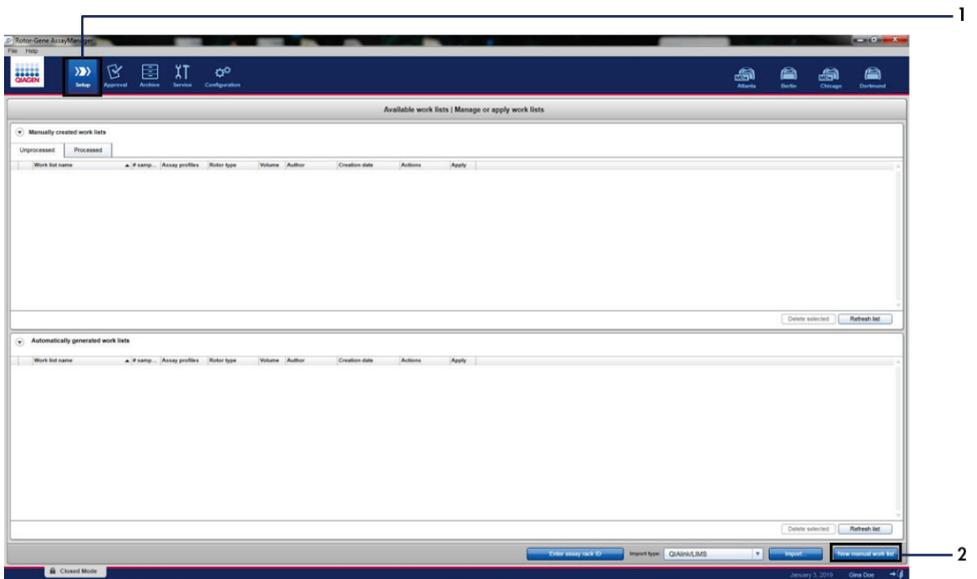


Abbildung 6. Einrichten einer neuen manuellen Arbeitsliste. 1 = Registerkarte „Setup“ (Einrichten), 2 = „New manual work list“ (Neue manuelle Arbeitsliste).

15. Wählen Sie die Registerkarte „Assays“ auf der linken Seite des Hauptfensters aus. Klicken Sie in der Liste der verfügbaren Assay-Profile für Gewebeprobe auf das Assay-Profil `therascreen_PIK3CA_FFPE` oder für Plasmaprobe auf das Assay-Profil `therascreen_PIK3CA_Plasma` und anschließend auf den blauen Pfeil, um das Assay-Profil auszuwählen. Wenn der Name des Assay-Profils verkürzt angezeigt wird, fahren Sie mit dem Mauszeiger über das Assay-Profil, um den vollständigen Namen zu sehen (Abbildung 7).

	<p>Vergewissern Sie sich, dass das korrekte Assay-Profil für den Spezimentyp ausgewählt wurde.</p>
---	--

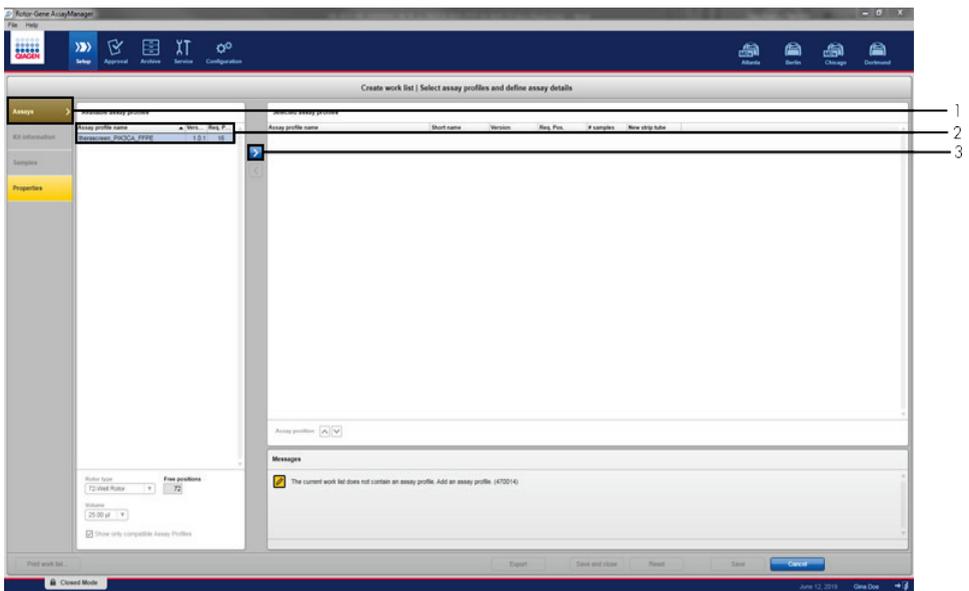


Abbildung 7. Einrichten einer neuen manuellen Arbeitsliste: Auswählen des Assay-Profils. 1 = Registerkarte „Assays“, 2 = verfügbare Assay-Profile mit „therascreen_PIK3CA_FFPE“ und „therascreen_PIK3CA_Plasma“, 3 = Auswählen des Assay-Profils.

16. Geben Sie im Fenster „Selected assay profiles“ (Ausgewählte Assay-Profile) die Anzahl zu testender Testproben ein, exklusive der Laufkontrollen (Abbildung 8).

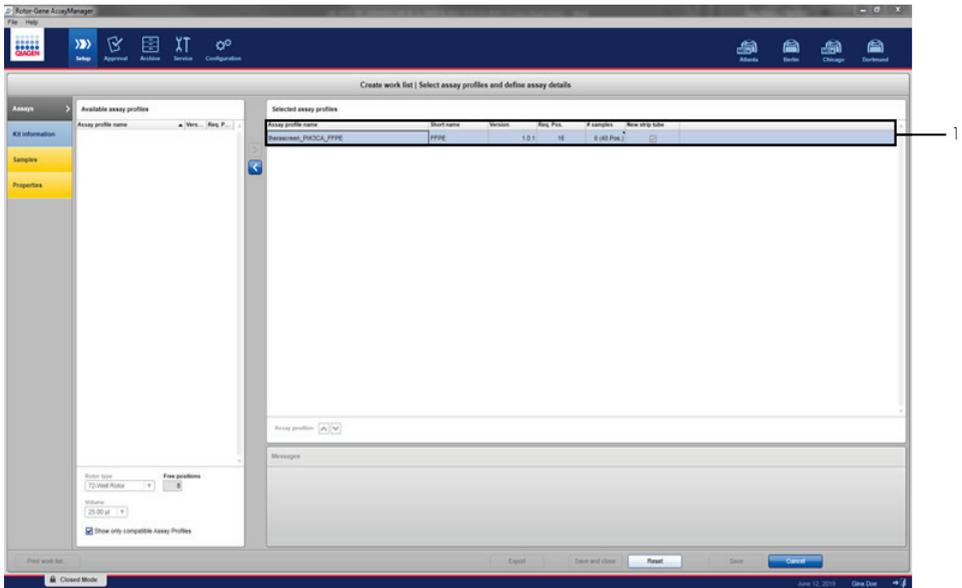


Abbildung 8. Hauptfenster „Create work list“ (Arbeitsliste erstellen). 1 = Eingabe der Probenanzahl.

17. Klicken Sie auf die Registerkarte „Kit information“ (Kit-Informationen). Wählen Sie „Enter kit information manually“ (Kit-Informationen manuell eingeben) aus und geben Sie die folgenden Kit-Informationen ein (Abbildung 9):

- Kit bar code (Kit-Barcode)
- Material number (Materialnummer)
- Lot number (Chargennummer)
- Kit expiry date (Verfallsdatum des Kits)

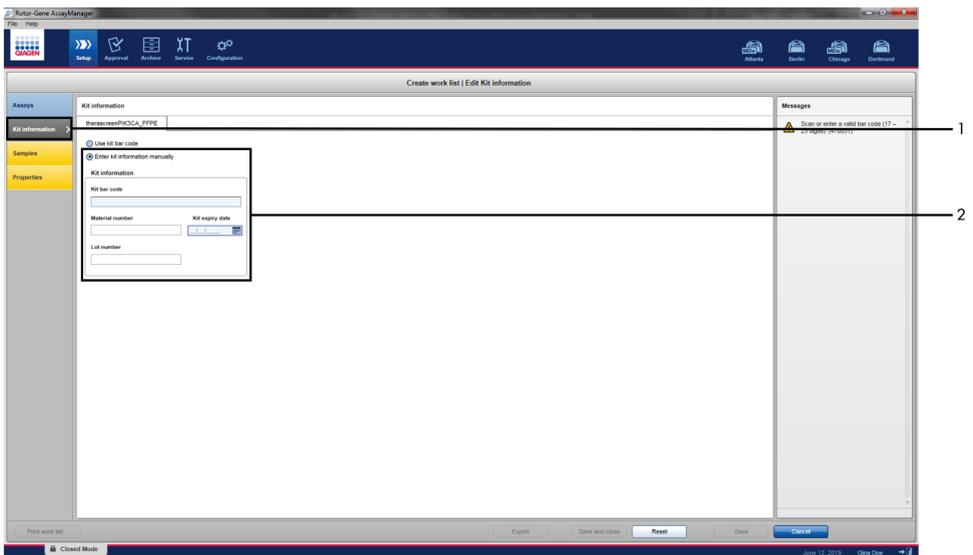


Abbildung 9. Hauptfenster „Create work list“ (Arbeitsliste erstellen). 1 = Registerkarte „Kit information“ (Kit-Informationen), 2 = Eingabe der Kit-Informationen.

18. Klicken Sie zur Eingabe von Probeninformationen auf die Registerkarte „Samples“ (Proben). Geben Sie die Probennamen manuell ein (Abbildung 10).

Hinweis: Vergewissern Sie sich vor Beginn des Laufs im Rotor-Gene AssayManager, dass alle Probenamen korrekt eingegeben wurden.

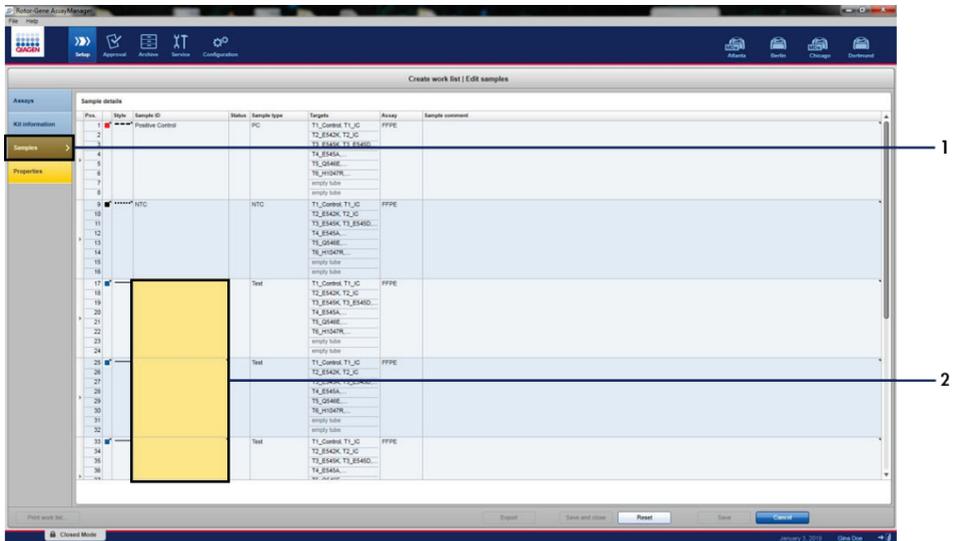


Abbildung 10. Hauptfenster „Create work list“ (Arbeitsliste erstellen). 1 = Registerkarte „Samples“ (Proben), 2 = Eingabe der Probennamen.

19. Klicken Sie auf die Registerkarte „Properties“ (Eigenschaften) und geben Sie den Namen der Arbeitsliste ein. Vergewissern Sie sich anschließend, dass die Kontrollkästchen „is editable“ (ist editierbar) und „work list is complete“ (Arbeitsliste ist vollständig) markiert sind. Klicken Sie auf die Schaltfläche „Apply“ (Anwenden) unten rechts, um die Arbeitsliste anzuwenden. Ein neues Fenster erscheint (Abbildung 11).

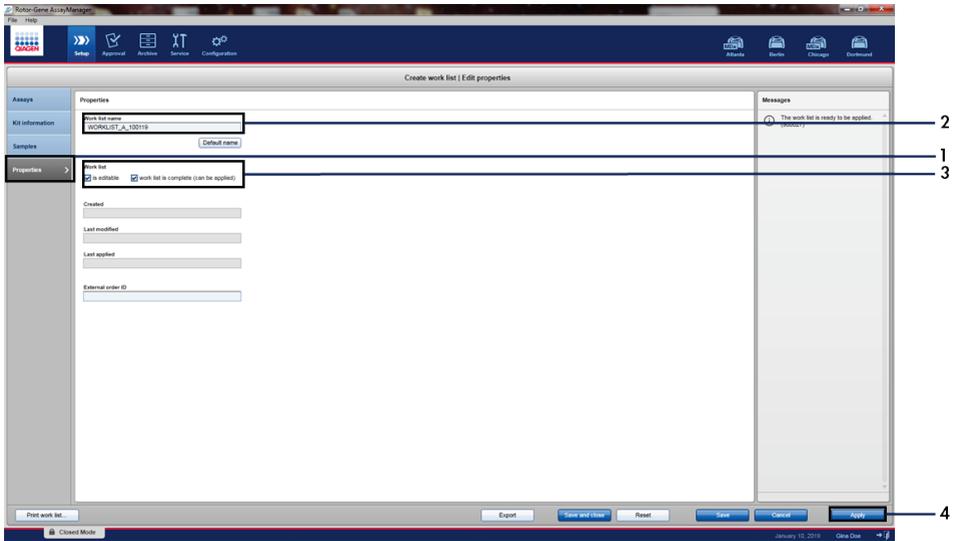


Abbildung 11. Hauptfenster „Create work list“ (Arbeitsliste erstellen). 1 = Registerkarte „Properties“ (Eigenschaften), 2 = Eingabe des Arbeitslistenamens, 3 = Auswahl von „is editable“ (ist editierbar) und „work list is complete“ (Arbeitsliste ist vollständig), 4 = „Apply“ (Anwenden).

20. Geben Sie in das Feld „Experiment name“ (Experimentname) den Namen des Experiments ein. Wählen Sie aus der Liste verfügbarer Thermocycler einen Thermocycler aus und vergewissern Sie sich, dass das Kontrollkästchen Ring attached (Ring angebracht) markiert ist (Abbildung 12).

Wenn Sie alle Schritte abgeschlossen haben, klicken Sie auf Start run (Lauf starten). Das RGQ-Symbol oben links auf dem Bildschirm wird nun grün, was anzeigt, dass der Lauf begonnen hat.

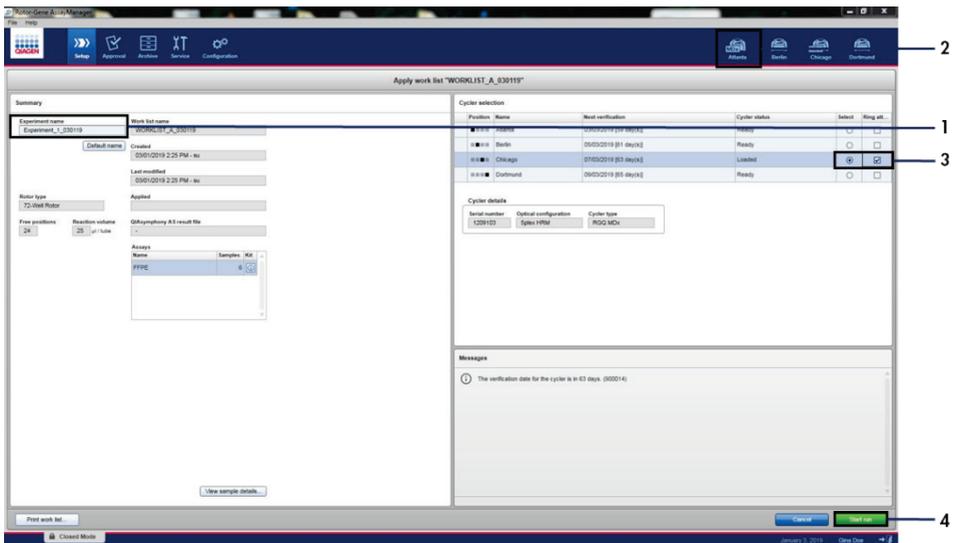


Abbildung 12. Anwenden einer Arbeitsliste und Start des Laufs. 1 = Eingabe des Experimentnamens, 2 = Auswahl des Instruments, 3 = Sicherstellung, dass „Ring attached“ (Ring angebracht) ausgewählt ist, 4 = Lauf starten.

Hinweis: Das Erscheinungsbild des Symbols „Cycler“ (Thermocycler) ändert sich abhängig vom Fortschritt und dem Ergebnis des Laufs. Vollständige Beschreibungen dieser Thermocycler-Symbole finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application Benutzerhandbuch*.

Beispiele für Thermocycler-Symbole sind in Abbildung 13 dargestellt.

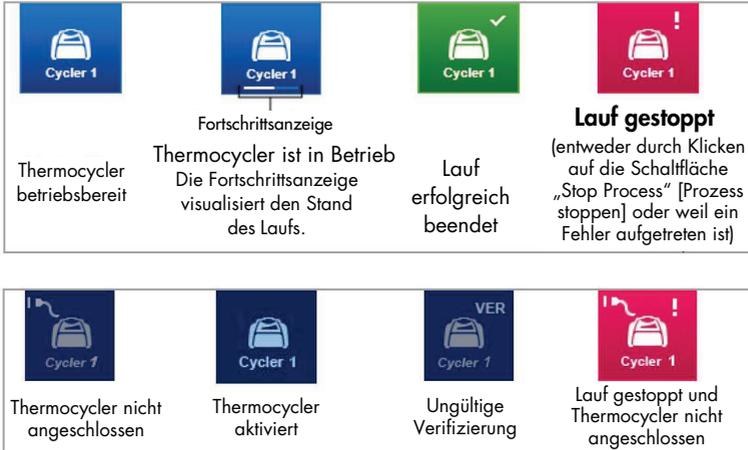


Abbildung 13. Thermocycler-Symbole, die angezeigt werden können.

21. Klicken Sie auf „Finish run“ (Lauf beenden), sobald der Lauf abgeschlossen ist. Es erscheint das Dialogfenster „Release and go to approval“ (Freigeben und mit Genehmigung fortfahren) (Abbildung 14).

Hinweis: Während des Laufprozesses werden die Amplifikationskurven in Echtzeit angezeigt und aktualisiert. Eine Fortschrittsanzeige unten links informiert über die Restlaufzeit.

Wichtig: Schließen Sie während des Laufs nicht das Fenster.



Abbildung 14. Abschließen eines Laufs. 1 = „Finish run“ (Lauf beenden).

22. Klicken Sie auf „Release and go to approval“ (Freigeben und mit Genehmigung fortfahren), um die Registerkarte „Approval“ (Genehmigung) zu öffnen und das Rotor-Gene Q Instrument freizugeben (Abbildung 15). Das RGQ-Symbol oben rechts auf dem Bildschirm wechselt von Grün nach Blau, was anzeigt, dass das Instrument nun bereit für die Durchführung des nächsten Laufs ist. Jeder Lauf muss stets freigegeben und genehmigt werden, unabhängig davon, ob er erfolgreich war oder nicht. Eine Liste mit potenziellen Störungen und Fehlercodes, die im Rotor-Gene AssayManager angezeigt werden können, finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application Benutzerhandbuch* und im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in Benutzerhandbuch*.

Position	Name	Run status
■ ■ ■	Chicago	Run Successful

Experiment name
Experiment_1_030119

Errors during run

Comment

Password

Release Release and go to approval Cancel 1

Abbildung 15. Pop-up-Fenster „Finish Run“ (Lauf beenden). 1 = „Release and go to approval“ (Freigeben und mit Genehmigung fortfahren).

23. Wählen Sie im Bereich „Assay selection“ (Assay-Auswahl) der Umgebung „Approval“ (Genehmigung) das Experiment aus und klicken Sie auf „Start approval“ (Genehmigung beginnen) (Abbildung 16).

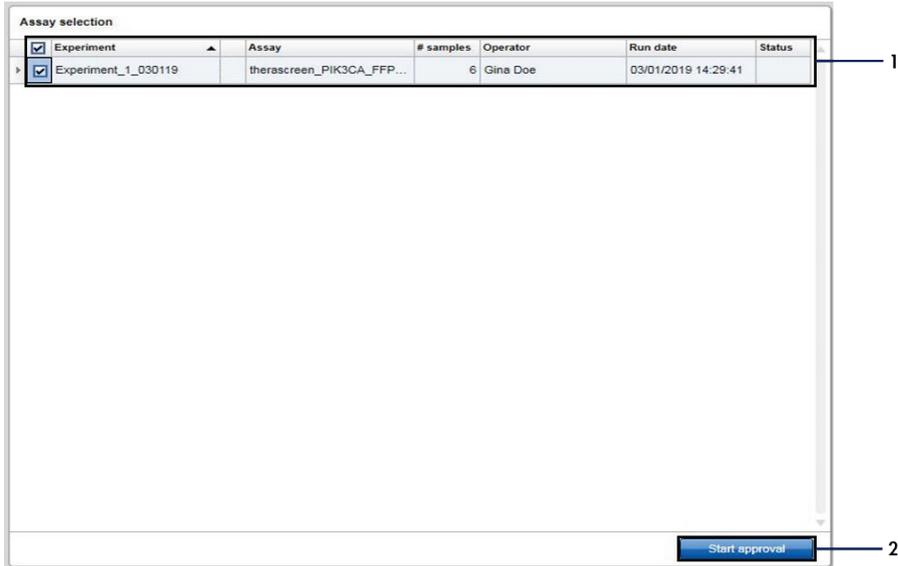


Abbildung 16. Beginnen des Freigabeprozesses in der Umgebung „Approval“ (Genehmigung). 1 = für die Genehmigung ausgewählter Assay, 2 = „Start approval“ (Genehmigung beginnen).

Im Bereich „Plots and information“ (Plots und Informationen) sind Informationen zu „Raw data“ (Rohdaten), „Processed data“ (Verarbeiteten Daten), „Assay“ und „Audit trail“ (Audit-Trail) verfügbar (1). Die Assay-Ergebnisse sind im Abschnitt „Results“ (Ergebnisse) zu finden (2).

Wenn die Positivkontrolle und die Nicht-Template-Kontrolle im zulässigen Bereich liegen, wird in der Spalte „Sample Status“ (Probenstatus) der Status „Valid“ (Gültig) angezeigt, andernfalls ist der angezeigte Probenstatus „Invalid“ (Ungültig).

Wenn eine der Laufkontrollen fehlschlägt, wird der Lauf ungültig. Alle Proben werden dann mit ASSAY_INVALID markiert.

Anweisungen, wie Sie in einem solchen Fall weiter vorgehen, finden Sie im Abschnitt „Statusindikatoren im thescreen PIK3CA Assay-Profil des Rotor-Gene AssayManager v2.1“ (Seite 55).

Hinweis: Das Assay-Profil enthält alle Regeln für die automatische Assay- und Probenanalyse und die Interpretation der Ergebnisse. Aus diesem Grund bewertet die Software die Gültigkeit oder Ungültigkeit von Proben und Kontrollen automatisch.

24. Klicken Sie auf „Release/report data“ (Daten freigeben/berichten). Es öffnet sich das Fenster „Release/report data“ (Daten freigeben/berichten) (Abbildung 17).

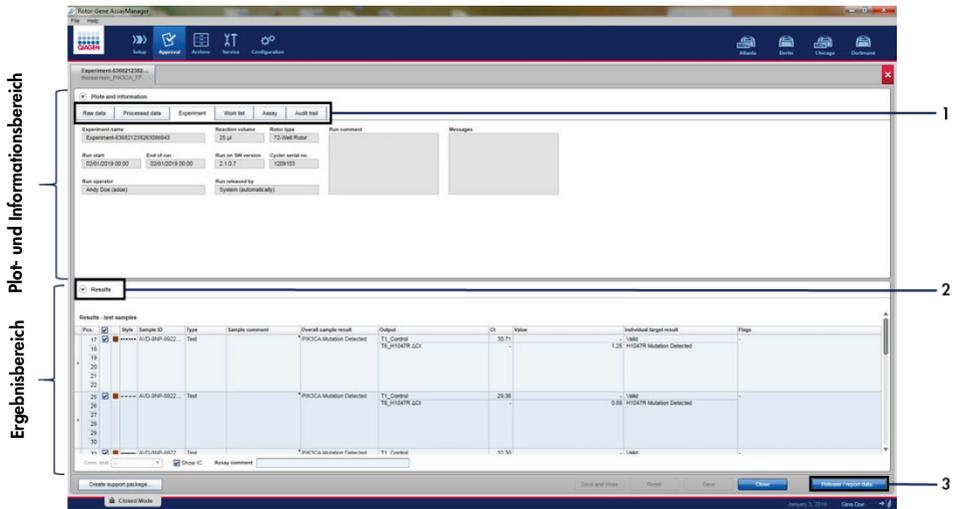


Abbildung 17. Beispiel für Hauptfenster mit Assay-Ergebnissen. 1 = Registerkarte „Experiment“ im Bereich „Plots and information“ (Plots and Information). 2 = Ergebnisbereich, 3 = „Release/report data“ (Daten freigeben/berichten).

25. Klicken Sie auf die Schaltfläche OK, um das Experiment im Archiv zu speichern und eine LIMS-Ausgabe sowie einen Laufbericht zu erstellen (Abbildung 18). Laufberichte und LIMS-Ausgaben werden im Standardverzeichnis für Berichte gespeichert. Das Standardverzeichnis ist unter „Default data export directories“ (Standardverzeichnisse für den Datenexport) in der Registerkarte „Configuration“ (Konfiguration) zu finden.

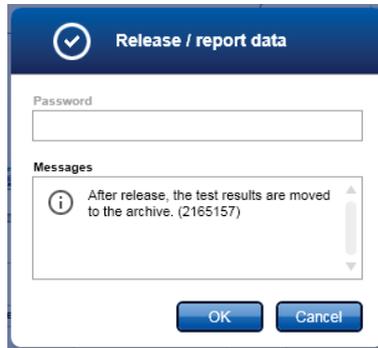


Abbildung 18. Beispiel des Fensters „Release/report data“ (Daten freigeben/berichten).

26. Um ein im Experimentarchiv gespeichertes Experiment aufzurufen, klicken Sie auf „Archive“ (Archiv) und suchen Sie mithilfe der Suchkriterien im Abschnitt „Filter Options“ (Filteroptionen) nach dem Experiment. Klicken Sie zum Suchen auf „Apply filter“ (Filter anwenden). Wählen Sie ein Experiment aus, indem Sie das Kontrollkästchen neben dem entsprechenden Experiment markieren, und klicken Sie auf „Show assays“ (Assays anzeigen) (Abbildung 19).

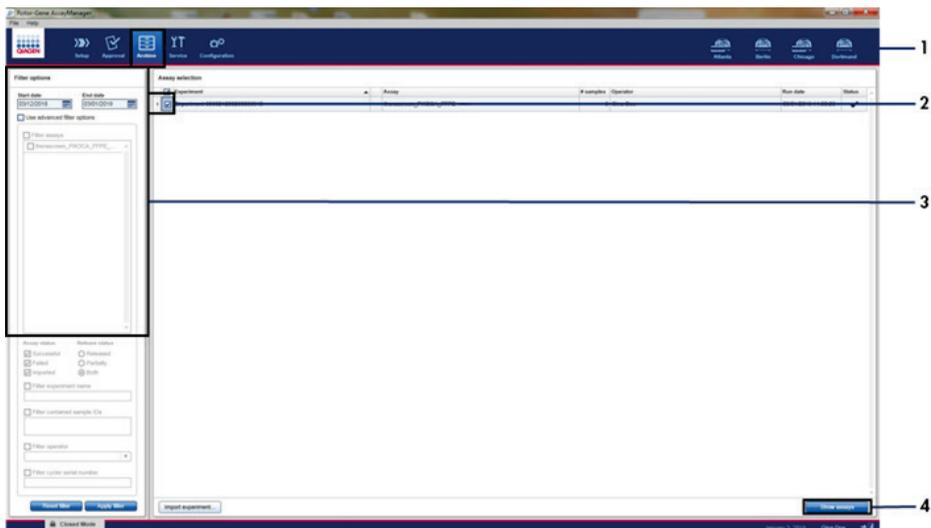


Abbildung 19. Beispiel für das Hauptfenster „Experiment Archive“ (Experimentarchiv). 1 = Registerkarte „Archive“ (Archiv), 2 = Suchoptionen, 3 = Auswahl des Experimentnamens, 4 = Registerkarte „Show assays“ (Assays anzeigen).

Ergebnisse

Das *therascreen* PIK3CA Assay-Profil führt nach Abschluss eines Testlaufs automatisch die Analyse durch und zeigt die Mutationsergebnisse an. Im Folgenden finden Sie weitere Informationen zur Durchführung der Analyse und Anzeige der Mutationsergebnisse durch das *therascreen* PIK3CA Assay-Profil.

Auswertung

Der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einer bestimmten Reaktion den vom *therascreen* PIK3CA Assay-Profil vorgegebenen Schwellenwert überschreitet, wird als C_T -Wert bezeichnet. C_T -Werte sind ein Maß für die Menge der jeweils aufgegebenen DNA. Niedrige C_T -Werte zeigen hohe DNA-Ausgangskonzentrationen an, wogegen hohe C_T -Werte für niedrige DNA-Ausgangskonzentrationen stehen. Reaktionen, in denen die Fluoreszenz den Schwellenwert bei oder vor diesem C_T -Wert überschreitet, werden als positiv eingestuft.

Auf der Grundlage der Kontrollreaktion zur Beurteilung der DNA-Probe kann anhand des ermittelten C_T -Werts festgestellt werden, ob die Proben DNA in einer Konzentration enthalten, die für die Analyse geeignet ist. Darüber hinaus können die Proben ermittelt werden, die vor der Analyse verdünnt werden müssen.

Durch die Bestimmung des C_T -Werts der Proben anhand verschiedener Mutationsreaktionsgemische kann mit dem *therascreen* PIK3CA Assay-Profil der ΔC_T -Wert der Probe berechnet werden. Dabei kommt die folgende Gleichung zum Einsatz:

$$\Delta C_T = [C_T\text{-Wert des Mutationsassays}] - [C_T\text{-Wert des Kontrollassays}]$$

Das *therascreen* PIK3CA Assay-Profil führt auf der Grundlage der analytisch bestimmten C_T - und ΔC_T -Werte eine qualitative Bestimmung des Mutationsstatus der DNA-Proben durch und gibt an, ob eine Probe eine oder mehrere Mutationen enthält.

Die Laufkontrollen (PC, NTC und IC) werden ausgewertet, um sicherzustellen, dass die C_T-Werte im zulässigen Bereich liegen und die Reaktionen erfolgreich durchgeführt wurden.

Wenn der C_T-Wert der Probenkontrolle unterhalb des zulässigen Bereichs liegt, wurde zu viel DNA aufgegeben. In diesem Fall muss die Probe gemäß der Beschreibung in „Statusindikatoren im *therascreen* PIK3CA Assay-Profil des Rotor-Gene AssayManager v2.1“, Seite 55, verdünnt werden.

Diese Beurteilungen werden allesamt automatisch durchgeführt und erfordern keine manuelle Interpretation. Das System überprüft automatisch die Validitätskriterien für Läufe und Proben. Für eine ungültige Probe oder einen ungültigen Lauf wird kein Mutationsstatus ausgegeben.

Die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software bestimmt das Ergebnis für jedes Biomarkerziel durch Kombination aller relevanten Auswertungsergebnisse aus den Kernauswertungsalgorithmen wie z. B. Normalisierung mit den Proben- und Assay-Regeln, die in dem entsprechenden Assay-Profil definiert sind.

Einer einzelnen Probe können die folgenden Ergebnisse zugewiesen werden:

- „PIK3CA Mutation Detected“ (PIK3CA-Mutation nachgewiesen)
- „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen)
- „INVALID“ (Ungültig): Wenn der Probe bei der Auswertung durch die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software eine oder mehrere Statusindikatoren zugewiesen werden, die definiert sind, das Zielergebnis auf „INVALID“ (Ungültig) zu setzen.

Hinweis: Wenn während des Laufs ein Fehler aufgetreten ist, müssen die Proben im Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM entsorgt werden. Sie dürfen nicht erneut getestet werden.

Statusindikatoren im *therascreen* PIK3CA Assay-Profil des Rotor-Gene AssayManager v2.1

Alle zum Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in gehörenden Statusindikatoren sind im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in Benutzerhandbuch* aufgeführt.

Die Statusindikatoren, die durch das *therascreen* PIK3CA Assay-Profil generiert werden können, ihre Bedeutung und die zu ergreifenden Maßnahmen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die Bezeichnungen der Statusindikatoren sind so aufgebaut, dass sie Informationen zur betroffenen Kit-Komponente, der betroffenen Probe oder Kontrolle und der Fehlerart liefern.

Zum Beispiel:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = Die Positivkontrolle (PC), Kontrollassay (CTRL_ASSAY), ist fehlgeschlagen (FAIL).
- NTC_INT_CTRL_FAIL = Die Nicht-Template-Kontrolle (NTC), interne Kontrolle (INT_CTRL), ist fehlgeschlagen (FAIL).
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = Die Probe (SAMPLE), Kontrollassay (CTRL), hat eine hohe Konzentration (HIGH_CONC).

Tabelle 6. Vom PIK3CA Assay-Profil verwendete Statusindikatoren

Statusindikator	Bedeutung	Maßnahme
IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	<p>Ungültiger Lauf.</p> <p>IC-Wert in PC- oder NTC-Röhrchen oberhalb des Spezifikationsbereichs.</p> <p>Ungültige Probe.</p> <p>IC in der Probe oberhalb des Spezifikationsbereichs.</p>	<p>Lauf wiederholen.</p> <p>Probe einmal erneut testen, wenn dann der C_T-Wert der Proben-IC weiterhin oberhalb des zulässigen Bereichs liegt, Probe erneut extrahieren. Wenn nach erneuter Extraktion und zwei weiteren Testläufen die Proben-IC noch immer oberhalb des zulässigen Bereichs liegt, ist die Probe als indeterminate (unbestimmt) einzustufen.</p>
(PC)_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	<p>Ungültiger Lauf.</p> <p>PC oberhalb des Spezifikationsbereichs.</p>	<p>Lauf wiederholen.</p>
(PC)_BELOW_ACCEPTED_RANGE	<p>Ungültiger Lauf.</p> <p>PC unterhalb des Spezifikationsbereichs.</p>	<p>Lauf wiederholen.</p>
IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	<p>Ungültiger Lauf.</p> <p>IC in PC- oder NTC-Röhrchen unterhalb des Spezifikationsbereichs.</p> <p>Ungültige Probe.</p> <p>IC in der Probe unterhalb des Spezifikationsbereichs.</p>	<p>Lauf wiederholen.</p> <p>Probe einmal erneut testen, wenn dann der C_T-Wert der Proben-IC weiterhin unterhalb des zulässigen Bereichs liegt, Probe erneut extrahieren. Wenn nach erneuter Extraktion und zwei weiteren Testläufen die Proben-IC noch immer unterhalb des zulässigen Bereichs liegt, ist die Probe als indeterminate (unbestimmt) einzustufen.</p>
UNEXPECTED_CT_VALUE	<p>Ungültiger Lauf.</p> <p>C_T-Wert wurde in NTC detektiert.</p>	<p>Lauf wiederholen.</p>
NO_CT_VALUE	<p>Ungültige PC oder IC.</p> <p>Kein C_T-Wert für PC in PC-Röhrchen oder für IC in PC- und NTC-Röhrchen.</p> <p>Ungültige Probe.</p> <p>Kein C_T-Wert in der Probe.</p>	<p>Lauf wiederholen.</p> <p>Probe einmal erneut testen, wenn dann noch immer kein C_T für die Proben-IC detektiert wird, Probe erneut extrahieren. Wenn nach erneuter Extraktion und zwei weiteren Testläufen noch immer keine Proben-IC detektiert werden kann, ist die Probe als indeterminate (unbestimmt) einzustufen.</p>

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Tabelle 6. Vom PIK3CA Assay-Profil verwendete Statusindikatoren, Fortsetzung

Statusindikator	Bedeutung	Maßnahme
DNA_INPUT_TOO_HIGH	Ungültige Probe. C _T -Wert der Probenkontrolle unterhalb des Arbeitsbereichs.	Die Konzentration der Probe ist zu hoch; sie muss verdünnt werden. Anweisungen im Abschnitt „C _T -Wert der Kontrolle“, Seite 57, befolgen.
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ungültige Probe. C _T -Wert der Probenkontrolle oberhalb des Arbeitsbereichs für die Kontrolle.	Probe einmal erneut testen; wenn dann der C _T -Wert der Kontrolle weiterhin oberhalb des Arbeitsbereichs für die Kontrolle liegt, Probe erneut extrahieren. Wenn nach erneuter Extraktion und zwei weiteren Testläufen der C _T -Wert der Kontrolle noch immer oberhalb des Arbeitsbereichs für die Kontrolle liegt, ist die Probe als indeterminate (unbestimmt) einzustufen.
TI_CONTROL_NO_CT_VALUE	Ungültige Probe. Kein C _T -Wert für Probe in Probenkontrollröhrchen.	Probe einmal erneut testen, wenn dann noch immer kein C _T -Wert für die Probe vorliegt, Probe erneut extrahieren. Wenn nach erneuter Extraktion und zwei weiteren Testläufen noch immer kein C _T -Wert für die Probe vorliegt, ist die Probe als indeterminate (unbestimmt) einzustufen.

Hinweis: Wenn eine erneut getestete Probe nach der Wiederholung aus einem anderen Grund ungültig ist, ist dieser Lauf trotzdem als zweiter Versuch anzusehen und eine erneute Extraktion der Probe ist durchzuführen.

C_T-Wert der Kontrolle

Es gibt zwei Statusindikatoren für ungültige Proben aufgrund des C_T-Werts der Kontrolle:

- **DNA_INPUT_TOO_HIGH:** Die Konzentration der Probe ist zu hoch und würde die Mutationsassays überlasten. Um für die Probe ein gültiges Ergebnis zu erzielen, muss die Probe verdünnt werden. Als Faustregel bei der Probenverdünnung gilt, dass eine Verdünnung um die Hälfte den C_T-Wert um 1 erhöht. Die Proben sind mit dem im Kit enthaltenen Wasser zu verdünnen (Wasser zur Verdünnung [Dil.]).

Berechnung der erforderlichen Verschiebung des C_T-Werts der Kontrolle (X_R) und Schätzung des erforderlichen Verdünnungsfaktors (Tabelle 7):

$$X_R = 25 - X \text{ (FFPE-Spezimen)}$$

$$X_R = 27 - X \text{ (Plasmaspezimen)}$$

wobei 25 (für FFPE-Spezimen) oder 27 (für Plasmaspezimen) der C_T-Sollwert für die Kontrolle in der verdünnten Probe ist und X ein tatsächlicher C_T-Wert der Kontrolle in der zu verdünnenden Probe.

Wenn X keine ganze Zahl ist, runden Sie den Wert auf die nächste ganze Zahl auf; so wird 2,1 z. B. auf 3,0 aufgerundet. Dieser Wert ist X_R. Der Verdünnungsfaktor ist Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7. Berechnung des Verdünnungsfaktors

X _R	Verdünnungsfaktor	Probenverhältnis	Verd.-Verhältnis
1	2-fach	1	1
2	4-fach	1	3
3	8-fach	1	7
4	16-fach	1	15
5	32-fach	1	31
6	64-fach	1	63
7*	128-fach	1	127
8*	256-fach	1	255

* Nur für Plasma.

- ABOVE_ACCEPTED_RANGE und T1_CONTROL_NO_CT_VALUE: Die Menge an DNA ist nicht ausreichend für die Mutationsanalyse. Testen Sie die Probe erneut mit ausreichend DNA-Eluat (> 30 µl). Wenn nach der Wiederholung die Menge an DNA noch immer nicht ausreicht, führen Sie eine erneute Extraktion aus frischen FFPE-Schnitten oder einem frischen Plasmaspezimen durch. Wenn das nicht möglich ist, ist die Probe als indeterminate (unbestimmt) einzustufen.

Leistungsmerkmale: Gewebespezimen

Analytische Leistung: Gewebespezimen

Die speziellen Leistungsmerkmale des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits wurden in Studien bestimmt, in denen aus Brustkrebspatienten gewonnene FFPE-Gewebespezimen und 12 FFPE-Spezimen aus humanen Zelllinien (FFPE-Zellinienspezimen) mit bekannten, durch den Assay nachgewiesenen *PIK3CA*-Mutationen sowie ein *PIK3CA*-Wild-type-(Wildtyp)-spezimen (d. h. das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit sollte keine Mutationen in Exons 7, 9 und 20 nachweisen können) verwendet wurden.

Leerwertgrenze (LoB): Gewebespezimen

Die Leerwertgrenze ist in der CLSI-Richtlinie EP17-A2 definiert als der „höchstmögliche Messwert, der für Leerproben wahrscheinlich (mit einer angegebenen Wahrscheinlichkeit) zu erwarten ist“. Für das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist dies der Datenpunkt, der dem oberen 95%-Perzentil in den mutationsnegativen Proben entspricht. Die LoB wurde ermittelt durch Analyse von 56 einzelnen klinischen FFPE-Wildtyp-Spezimen (30 RES-Spezimen und 26 Stanzbiopsiespezimen), welche mit jedem der drei *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits jeweils in Doppelbestimmung getestet wurden, sodass insgesamt 336 Datenpunkte generiert wurden. Für die mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bestimmten LoB-Werte für die einzelnen Mutationsassays (hinsichtlich ΔC_T) wurde nachgewiesen, dass sie oberhalb der für jeden der Assays ermittelten ΔC_T -Cutoff-Werte liegen. Die Werte sind nachstehend zusammen mit dem jeweiligen Anteil falsch-positiver Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 8. Zusammenfassung der LoB-Ergebnisse

Exon	Mutation	Basenaustausch	LoB (ΔC_T -Wert)	Falsch-positiv-Rate (%)
7	C420R	1258T>C	7,57	0,94
9	E542K	1624G>A	5,09	1,88
	E545A	1634A>C	13,03	0,00
	E545D	1635G>T	9,19	0,31
	E545G	1634A>G	13,03	0,00
	E545K	1633G>A	6,74	1,57
	Q546E	1636C>G	13,03	0,00
	Q546R	1637A>G	8,72	0,00
20	H1047L	3140A>T	12,63	0,94
	H1047R	3140A>G	9,80	1,25
	H1047Y	3139C>T	7,61	0,63

Nachweisgrenze (LoD): Gewebespezimen

Es wurde eine Studie durchgeführt, um für jede der 11 *PIK3CA*-Mutationen die Nachweisgrenze zu bestimmen. Die LoD war definiert als die niedrigste Menge an mutierter DNA vor einem Hintergrund von Wild-type-(Wildtyp-)DNA, bei der eine Probe mit einer Mutante bei 95 % der Tests noch ein mutationspositives Resultat ergibt (C_{95}). Die LoDs für die 11 mit dem *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit durchgeführten *PIK3CA*-Mutationsassays sind als MAF (mutant allele frequency, Frequenz mutierter Allele) angegeben. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze für jede Mutation wurden klinische FFPE-Spezimen aus Brustkrebs oder DNA aus FFPE-Zelllinien mit unterschiedlichen prozentualen Mutationsanteilen durch Verdünnung in einem klinischen FFPE-Wildtyp-Hintergrund so vorbereitet, dass nur geringe Mengen an DNA aufgegeben wurden. Für jede *PIK3CA*-Mutation wurde der Prozentsatz korrekter Bestimmungen über die verschiedenen Verdünnungsgrade hinweg mit *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kits aus drei verschiedenen Chargen in je 24 Replikaten pro Kitcharge pro fünf bis sechs MAF-Level getestet. Die LoD für die einzelnen Assays wurde mithilfe eines „Probit-Verfahren“ berechnet. (Tabelle 9). Der endgültige LoD-Wert für jede Mutation wurde als der jeweils höchste Wert

(hinsichtlich MAF) aus den drei Chargen des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits festgelegt. Zur Verifizierung der LoD wurden Mutationsproben an der ermittelten LoD getestet; die Positiv-Testrate wurde in der Wiederholbarkeits- und Reproduzierbarkeitsstudie verifiziert.

Tabelle 9. Unter Verwendung von Proben mit geringer DNA-Ausgangsmenge aus klinischen FFPE-Spezimen und FFPE-Zelllinienspezimen ermittelte LoD für Gewebespezimen

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basenaustausch	LoD (% MAF)
7	C420R	757	1258T>C	2,41 [†]
9	E542K	760	1624G>A	5,47 [‡]
	E545A	12458	1634A>C	3,54 [†]
	E545D	765	1635G>T	2,69 [‡]
	E545G	764	1634A>G	4,98 [‡]
	E545K	763	1633G>A	4,13 [‡]
	Q546E	6147	1636C>G	4,50 [†]
	Q546R	12459	1637A>G	6,08 [‡]
20	H1047L	776	3140A>T	2,56 [‡]
	H1047R	775	3140A>G	3,13 [‡]
	H1047Y	774	3139C>T	14,04 [†]

MAF: Mutant allele frequency (Frequenz mutierter Allele).

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

[†] LoD-Werte wurden ermittelt unter Verwendung von DNA aus Zelllinienspezimen.

[‡] LoD-Werte wurden ermittelt unter Verwendung von DNA aus klinischen Spezimen.

Ausgangsmengen genomischer DNA: Gewebespezimen

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit arbeitet nicht mit einer spektrophotometrisch ermittelten spezifischen DNA-Konzentration. Die DNA-Ausgangsmenge basiert auf dem C_T -Ergebnis der Kontrollreaktion, mit welcher nachgewiesen wird, dass ausreichend amplifizierbare DNA in der Probe vorhanden ist. Der Arbeitsbereich für den C_T -Wert der Kontrolle wurde unter Verwendung von insgesamt 20 klinischen FFPE-Wildtyp-Spezimen bestimmt, wobei 107 Datenpunkte generiert wurden. Der Arbeitsbereich für den C_T -Wert der Kontrolle wurde durch Berechnung von Toleranzintervallen festgelegt. Der C_T -Bereich der Kontrollreaktion wurde auf 23,23 bis 33,38 festgesetzt.

ΔC_T -Cut-off-Werte: Gewebespezimen

Der Cut-off-Wert des Assays ist ein spezifischer ΔC_T -Wert zur Bestimmung, ob eine Probe als positiv oder negativ für eine *PIK3CA*-Mutation eingestuft wird. Proben, deren ΔC_T -Werte bei oder unter dem Cut-off liegen, werden als *PIK3CA*-mutationspositiv eingestuft (d. h. *PIK3CA*-Mutation nachgewiesen) und Proben mit ΔC_T -Werten oberhalb des Cut-offs werden als *PIK3CA*-mutationsnegativ (d. h. keine Mutation nachgewiesen) eingestuft. Zur Bestimmung der Cut-off-Werte für alle Mutationen wurde ein Gemisch aus Zelllinien, klinischen Spezimen und vorab extrahierter Zelllinien-DNA verwendet. Die Cut-offs wurden mit Bezug auf die folgenden Parameter gewählt: Falsch-positiv-Rate, Falsch-negativ-Rate und Assay-Empfindlichkeit.

Die Cut-offs der einzelnen mit dem *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit durchgeführten Assays sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10. Cut-off-Werte für die einzelnen Mutationsassays beim Testen von DNA aus Gewebespezimen

Assay	Cut-off-Wert (ΔC_T)
C420R	$\leq 6,0$
E542K	$\leq 4,8$
E545A	$\leq 10,0$
E545D	$\leq 7,5$
E545G	$\leq 9,5$
E545K	$\leq 6,5$
Q546E	$\leq 10,0$
Q546R	$\leq 7,0$
H1047L	$\leq 10,0$
H1047R	$\leq 7,0$
H1047Y	$\leq 6,2$

Auswirkung der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_T -Werte (Linearität): Gewebespezimen

Die DNA-Ausgangsmenge ist definiert als die Gesamtmenge amplifizierbarer-DNA in einer Probe, bestimmt anhand der C_T -Werte der *PIK3CA*-Kontrollreaktion. Um zu zeigen, dass die Leistung des *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kits* über den gesamten C_T -Wertebereich der Kontrollreaktion (23,23 bis 33,38) gleichbleibend ist, wurde eine 9-stufige Verdünnungsreihe mit variierenden DNA-Ausgangsmengen mutationspositiver Proben ausgewertet, wobei die obersten und untersten Stufen außerhalb des C_T -Arbeitsbereichs der Kontrollreaktion (23,23–33,38) lagen. In dieser Studie wurde mit drei verschiedenen Spezimentypen gearbeitet: klinischen FFPE-Resektionsspezimen, FFPE-Zelllinienspezimen und vorab extrahierter gDNA aus Zelllinien. Die MAFs wurden bei variierender DNA-Ausgangsmenge konstant gehalten. Die C_T -Sollwerte für die Verdünnungsstufen 1 und 9 lagen für jede Mutation bei etwa 23,00 bzw. 33,50. Beide Werte wurden absichtlich so gewählt, dass sie außerhalb des C_T -Bereichs der Kontrollreaktion liegen.

Die Untersuchung wurde mit einer Charge des *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kits* durchgeführt. Pro DNA-Stufe wurden drei Replikate getestet. Die Datenauswertung erfolgte mittels Regressionsanalyse zur Bestimmung des linearen Bereichs. Damit der Assay über die DNA-Ausgangsmengen als linear bestimmt werden kann, darf sich ΔC_T über den Bereich hinweg nicht ändern, d. h. es darf kein statistisch signifikanter linearer, quadratischer oder kubischer Effekt vorliegen. Insgesamt waren die bei den verschiedenen DNA-Ausgangsmengen gemessenen ΔC_T -Werte über den Arbeitsbereich des *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kits* hinweg für die Mutationen E542K, E545D, E545G, E545A, H1047Y, Q546E, C420R und H1047R konstant, d. h. für diese Assays ergab sich kein statistisch signifikanter p-Wert ($p > 0,05$) für die linearen, quadratischen und kubischen Effekte bei Anpassung an alle getesteten Modelle. Die Assays für E545K, Q546R, and H1047L zeigen keinen linearen ΔC_T -Wert über die gesamten DNA-Ausgangsmengen. Für den E545K-Assay wurde ein linearer Bereich zwischen C_T 24,08 und 31,02 beobachtet. Für den Q546R-Assay wurde ein linearer Bereich zwischen C_T 24,28 und 32,69 beobachtet. Für den H1047L-Assay wurde ein linearer Bereich zwischen C_T 25,74 und 31,61 beobachtet. Eine Untersuchung ergab, dass die nicht-linearen Effekte keine Auswirkungen

auf die Leistung der E545K- und H1047L-Assays hatten. Es wurde allerdings ein Effekt auf die Leistung des Q546R-Assays festgestellt; Proben im Bereich der Nachweisgrenze können bei großer DNA-Ausgangsmenge als falsch-negativ eingestuft werden (C_T der Kontrolle ca. 23). Die Wahrscheinlichkeit dafür ist jedoch äußerst gering; sie liegt bei ca. 0,0052 %.

Assayspezifität (Kreuzreaktivität/Spezifität): Gewebespezimen

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit umfasst sechs verschiedene Reaktionsgemische: eine einzelne Kontrollreaktion, die eine Region in Exon 15 des *PIK3CA*-Gens nachweist, sowie 11 Mutationsassays zum Nachweis von *PIK3CA*-Mutationen. Es gibt keine Reaktion zur spezifischen Messung der *PIK3CA*-Wildtyp-Sequenz in Exons 7, 9 oder 20. Das Ergebnis „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits ergibt sich, wenn keine positiven Mutationsergebnisse vorliegen.

Um zu beurteilen, ob die Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen durch den Assay nachgewiesenen Mutationen bei der Festlegung der analytischen Cut-off-Werte korrekt berücksichtigt wurde, wurden mutationspositive klinische Spezimen und Zelllinienspezimen in Doppelbestimmung getestet. Dabei wurden drei Chargen des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits mit geringer DNA-Ausgangsmenge und geringer MAF% sowie hoher DNA-Ausgangsmenge und hoher MAF% verwendet, und es wurden insgesamt 240 Datenpunkte generiert. Im Rahmen dieser Studie kam es einmal zu einer Kreuzreaktivität zwischen E545D und H1047R, und einmal zwischen C420R und H1047R. Weiterhin gab es vier Fälle nicht-mutationspezifischer Amplifikationen zwischen der Probe E545A mit hoher MAF und H1047L. Insgesamt wiesen 6/240 Datenpunkten nicht-mutationspezifische Amplifikation auf. Die sechs Datenpunkte mit nicht-mutationspezifischer Amplifikation waren sporadisch und zeigten keine Übereinstimmung mit anderen Replikaten der gleichen Probe. Aus diesem Grund wurden diese Resultate nicht als Ergebnis einer Kreuzreaktivität bewertet. Eine PCR-Kreuzreaktivität wurde jedoch zwischen H1047L und H1047R festgestellt. Diese Kreuzreaktivität ist einseitig, d. h. für eine Probe, die sowohl die Mutation H1047R als auch H1047L enthält, wird nur das Ergebnis „H1047R Mutation Detected“ (H1047R-Mutation nachgewiesen) ausgegeben. Diese Regel wurde in den automatisierten Algorithmus des „*therascreen*_PIK3CA_FFPE“-Assay-Profiles integriert.

Störungen: Gewebespezimen

Effekte durch nekrotisches Gewebe

Um eine mögliche Beeinträchtigung der Leistung des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits durch nekrotisches Gewebe in FFPE-Spezimen aus Brustkrebs zu untersuchen, wurden klinische FFPE-Spezimen aus SOLAR-1 mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit und mittels Next Generation Sequencing (NGS) analysiert. Insgesamt wurden 180 gemäß NGS *PIK3CA*-mutationsnegative und 199 gemäß NGS *PIK3CA* mutationspositive Spezimen untersucht, sowohl Stanzbiopsie- als auch RES-Spezimen. Der durch einen Pathologen bewertete prozentuale Nekroseanteil variierte zwischen 0 und 10 % für mutationsnegative und 0 und 20 % für mutationspositive Proben.

Sowohl für die mutationspositiven als auch für die mutationsnegativen FFPE-Spezimen ergaben sich mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit für insgesamt 20 Proben Ergebnisse, die den gemäß NGS erwarteten widersprachen. Diese Ergebnisse stammten von 17 mutationsnegativen und zwei mutationspositiven Proben mit unter 5 % Nekroseanteil sowie einer mutationsnegativen Probe mit unter 10 % Nekroseanteil. Damit ist es unwahrscheinlich, dass die Nekrose die Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse war. Die Ergebnisse befürworten die Verwendung des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits für FFPE-Spezimen aus Brustkrebs mit einem nekrotischen Gewebeanteil von bis zu 20 %.

Effekte durch Hämoglobin und exogene Substanzen

Die Auswirkungen potenzieller Störsubstanzen aus dem FFPE-Extraktionskit (exogener Substanzen) oder aus der Probe selbst (Hämoglobin) auf die Assayleistung wurde durch Vergleich des ΔC_T -Werts zwischen mit Störsubstanzen versetzten und mit Kontrollsubstanzen versetzten Extrakten der einzelnen Mutanten und Vergleich der Anteile korrekter Bestimmungen für Wildtyp-DNA-Proben ermittelt.

Es wurden die folgenden, im DNA-Extraktionsprozess eingesetzten exogenen Substanzen getestet:

- Paraffin
- Xylen
- Ethanol
- Buffer ATL
- Proteinase K
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2

Die mit exogenen Störsubstanzen zu versetzenden Proben wurden zunächst auf einen C_T von 30,00 normalisiert und dann mit Wild-type (Wildtyp) (ebenfalls auf C_T von 30,00 normalisiert) verdünnt, um den bei einer dem 3-fachen der Nachweisgrenze entsprechenden MAF erwarteten ΔC_T zu erhalten. Proben, die im Extraktionsprozess mit Hämoglobin (endogene Störsubstanz) versetzt wurden, wurden vor der Mutationsanalyse nicht auf einen C_T von 30,00 normalisiert oder auf das 3-fache der Nachweisgrenze verdünnt, sondern direkt nach der Extraktion verwendet. So sollte eine versehentliche Entfernung etwaiger durch die Störsubstanz eingebrachter Variabilitäten vermieden werden.

Für diese Studie mussten ein Satz Testproben sowie ein Satz Leerproben vorbereitet werden (Buffer ATE für exogene Substanzen und Wasser für Hämoglobin). Der Satz Testproben umfasste alle mit einer Störsubstanz versetzten Mutanten- und Wildtyp-Proben. Der Satz Leerproben umfasste mit einer geeigneten Kontrollsubstanz versetzte Mutanten- und Wildtyp-Proben. Die mit Hämoglobin getesteten Proben wurden während des Extraktionsprozesses mit diesem versetzt, um das Einbringen von Verunreinigungen über die FFPE-Probe zu simulieren. Die Testkonzentration von Hämoglobin und das geschätzte, im Extraktionsprozess eingesetzte Gewebevolumen basierten auf CLSI-Richtlinien (CLSI EP7-A2, Anhang D, 2005, Interference

Testing in Clinical Chemistry; genehmigte Richtlinie). Die für Hämoglobin empfohlene Testkonzentration gemäß EP07-A, Anhang D, 2005, beträgt 2 mg/ml. Die mit potenziellen exogenen Störsubstanzen getesteten Proben wurden nach der Normalisierung auf C_T 30,00 und Verdünnung auf 3x LoD mit den Substanzen in Konzentrationen versetzt, die den höchsten (schlimmstmöglichen) realistischen Mengen der Störsubstanzen entsprachen, die in eine Probe verschleppt werden können (10x Konzentration). Insgesamt wurde jede Probe-/Störsubstanz-Kombination mit einer Charge des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits getestet. Die Mutationsergebnisse für Mutanten- und Wildtyp-Proben entsprachen den Erwartungen. In den Fällen, in denen ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Störsubstanz versetzten und den Kontrollproben festgestellt wurde, lag dieser innerhalb der Laborpräzision und damit der inhärenten Variabilität des Assays. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass diese Substanzen die Ergebnisse des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits nicht beeinträchtigen.

Austauschbarkeit der Chargen: Gewebespezimen

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR System arbeitet mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit für die Isolierung von DNA sowie dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit für die DNA-Amplifikation und den Nachweis des *PIK3CA*-Mutationsstatus. Die Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit wurde anhand von drei Chargen des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits und drei Chargen des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits nachgewiesen. Der Gesamtprozentsatz korrekter Ergebnisse für alle mutationspositiven und Wild-type-(Wildtyp-) Proben über die Chargen hinweg betrug 96,8 % (363/375).

Handhabung der Spezimen: Gewebespezimen

Die Reproduzierbarkeit des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits wurde unter Verwendung von Schnitten aus 11 FFPE-Gewebeblöcken, vier klinischen Brustkrebspezimen mit *PIK3CA*-Mutation, sechs Zelllinienspezimen mit *PIK3CA*-Mutation und einem klinischen Wildtyp-Brustkrebspezimen untersucht. Für jedes Spezimen wurden die Extraktionen in Dreifachbestimmung, durch zwei Anwender und an drei Standorten durchgeführt, sodass insgesamt 18 Datenpunkte pro Spezimen generiert wurden. Die Tests an jedem Standort

wurden mit einer Charge des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits und einer Charge des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits durchgeführt. Alle gültigen Ergebnisse der mutierten und Wildtyp-Proben ergaben zusammen das erwartete Gesamtergebnis für den Mutationsstatus (korrekte Bestimmungen = 100 %, 18/18 für jedes Spezimen). Über verschiedene spezifische *PIK3CA*-Mutationsbestimmungen hinweg betrug der Anteil korrekter Bestimmungen 97,92 %, was die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits in der präanalytischen Phase der DNA-Isolierung bekräftigt.

Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit: Gewebespezimen

Präzision und Reproduzierbarkeit des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits wurden untersucht, indem aus klinischen FFPE-Brustkrebspezimen extrahierte DNA auf die *PIK3CA*-Mutationen E542K, E545G, E545K, H1047L, H1047R und Q546R, und DNA aus FFPE-Zelllinienproben auf die *PIK3CA*-Mutationen C420R, E545A, E545D, H1047Y, Q546E und Q546R getestet wurde. Klinische FFPE-Wildtyp-Brustspezimen wurden im Rahmen der Studie ebenfalls untersucht (Tabelle 11).

Zur Demonstration der Wiederholbarkeit wurden Proben auf zwei Mutationsraten (LoD und 3x LoD) in Doppelbestimmung mit zwei Läufen pro Tag, durch drei Anwender und an 20 nicht aufeinanderfolgenden Tagen an einem Standort (in Großbritannien) getestet, wobei 120 Datenpunkte generiert wurden. Ausnahmen bildeten Proben mit den *PIK3CA*-Mutationen E545A und Q546R im Bereich der Nachweisgrenze. Proben mit E545A- und Q546R-Mutationen bei der LoD wurden an einem Standort an sechs Tagen und durch drei Anwender mit je zwei Läufen und vier Wiederholungen untersucht, sodass insgesamt 144 Messungen zum Nachweis der Wiederholbarkeit durchgeführt wurden. Zur Demonstration der Reproduzierbarkeit wurden an zwei zusätzlichen Standorten (beide in den USA) zwei Läufe pro Tag pro Anwender (drei Anwender je Standort) über 10 Tage hinweg durchgeführt, wobei für jeden zusätzlichen Standort 60 weitere Datenpunkte generiert wurden. Ausnahmen bildeten die Proben mit den *PIK3CA*-Mutationen E545A und Q546R im Bereich der Nachweisgrenze. Proben mit E545A- und Q546R-*PIK3CA*-Mutationen bei einer LoD wurden an zwei weiteren Standorten für jeweils sechs Tage durch drei Anwender mit je zwei Läufen

und vier Wiederholungen untersucht, sodass insgesamt pro Standort 144 und für alle drei Standorte zusammen 432 Messungen durchgeführt wurden. An jedem Standort wurden die Proben mit zwei Chargen des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits getestet (drei Chargen für drei Standorte). Eine von zwei Chargen des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits wurde für die Extraktion von DNA aus FFPE-Spezimen verwendet. Die Proben wurden auf eine geringe DNA-Ausgangsmenge eingestellt, mit einem C_T -Zielwert für die Kontrolle von ca. 30.

Die mutationspositiven Proben wurden nur mit dem Kontrollreaktionsgemisch und dem der Zielmutation entsprechenden Reaktionsgemisch getestet. Wildtyp-Proben wurden mit allen Reaktionsgemischen getestet.

In Tabelle 11 ist für jede Probe der Anteil korrekter Bestimmungen aufgeführt, um die Wiederholbarkeit zu demonstrieren.

Tabelle 11. Wiederholbarkeit des Assays – Anteil korrekter Bestimmungen für PIK3CA-Mutationen in aus FFPE-Gewebespezimen gewonnenen DNA-Proben

Exon	Mutation	Mutationsrate	Anteil gültiger Ergebnisse	Korrekte Bestimmungen, %	Untergrenze zweiseitiges 95%-KI
n. z.	Wildtyp	n. z.	108/120	90,00	83,18
7	C420R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
9	E542K	LoD	119/119	100,00	96,95
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545A	LoD*	144/144	100,00	97,47
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545D	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545G	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545K	LoD	118/120	98,33	94,11
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	Q546E	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	Q546R	LoD*	139/140	99,29	96,08
		3x LoD	119/119	100,00	96,95
20	H1047L	LoD	117/120	97,50	92,87
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047Y	LoD	117/120	97,50	92,87
		3x LoD	120/120	100,00	96,97

n. z.: nicht zutreffend.

* Die Proben mit den PIK3CA-Mutationen E545A und Q546R im Bereich der LoD wurden an einem Standort für sechs Tage durch drei Anwender mit je zwei Läufen und vier Wiederholungen untersucht, sodass insgesamt 144 Messungen durchgeführt wurden.

Tabelle 12. Reproduzierbarkeit des Assays – Anteil korrekter Bestimmungen für *PIK3CA*-Mutationen in aus FFPE-Gewebespezimen gewonnenen DNA-Proben

Exon	Mutation	Mutationsrate	Anteil gültiger Ergebnisse	Korrekte Bestimmungen, %	Untergrenze zweiseitiges 95%-KI
n. z.	Wildtyp	n. z.	222/240	92,50	88,41
7	C420R	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
9	E542K	LoD	237/239	99,16	97,01
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545A	LoD*	431/432	99,77	98,73
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545D	LoD	238/240	99,17	97,02
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545G	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545K	LoD	238/240	99,17	97,02
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	Q546E	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	Q546R	LoD*	421/424	99,29	97,95
		3x LoD	239/239	100,00	98,47
20	H1047L	LoD	230/240	95,83	92,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	H1047R	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	H1047Y	LoD	234/240	97,50	94,64
		3x LoD	240/240	100,00	98,47

n. z.: nicht zutreffend.

* Die Proben mit den *PIK3CA*-Mutationen E545A und Q546R im Bereich der LoD wurden an drei Standorten für sechs Tage durch drei Anwender mit je zwei Läufen und vier Wiederholungen untersucht, sodass pro Standort 144 und insgesamt 432 Messungen durchgeführt wurden.

Die Standardabweichung für die Inter-Kit-, Inter-Lauf-, Inter-Anwender-, Inter-Instrument-, Inter-Tag- und Intra-Lauf-Variabilität wurde anhand einer Varianzkomponentenanalyse bestimmt, um Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit zu ermitteln. Über alle Varianzkomponenten hinweg

betrug die Standardabweichung (standard deviation, SD) $\leq 1,32 \Delta C_T$ für 1x LoD und $\leq 0,63 \Delta C_T$ für 3x LoD bei allen *PIK3CA*-Mutationen, die im Reproduzierbarkeitstest untersucht wurden. Über alle Vertreter des Mutationen-Panels hinweg betrug die SD $\leq 0,17 \Delta C_T$ für 1x LoD und $\leq 0,16 \Delta C_T$ für 3x LoD von Charge zu Charge (Chargen-Austauschbarkeit). Die SD für die Intra-Lauf-Variabilität (Wiederholbarkeit) betrug $\leq 1,24 \Delta C_T$ für LoD und $\leq 0,53 \Delta C_T$ für 3x LoD.

Kreuzkontaminationen/analytische Verschleppung: Gewebespezimen

Zweck dieser Studie war die Bewertung des *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kits bei der gleichzeitigen Analyse von deutlich *PIK3CA*-mutationspositiven Proben und *PIK3CA*-mutationsnegativen Proben. In dieser Studie wurde über das gesamte Testverfahren hinweg (DNA-Extraktion und anschließende Tests mit dem *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit) die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzkontamination untersucht.

Die Studie wurde an H1047R- (der Mutation mit der höchsten Prävalenz) und FFPE-Wildtyp-Zelllinienspezimen durchgeführt. Zwei unabhängige Sätze von Proben, „Set A“ (Satz A) und „Set B“ (Satz B), wurden anhand eines vordefinierten Extraktionsprotokolls extrahiert, das darauf ausgelegt war, ein Risiko für Kreuzkontaminationen zu schaffen. Die Extraktionen wurden durch zwei Anwender ausgeführt. Für die mutationspositiven Proben (H1047R) wurden insgesamt 18 Extraktionen (neun pro Satz) durchgeführt. Für die Wild-type-(Wildtyp-) Proben wurden insgesamt 42 Extraktionen (21 pro Satz) durchgeführt. Die Extrakte wurden in zehn PCR-Läufen auf Mutationen untersucht; pro Probensatz wurden je fünf aufeinanderfolgende Läufe durch den gleichen Anwender unter Verwendung der gleichen Ausrüstung und des gleichen Rotor-Gene Q Instruments ausgeführt. Dazwischen wurden das Instrument für keine anderen Läufe verwendet. Die Extrakte wurden mit dem Reaktionsgemisch für den Kontrollassay (*therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit Röhrchen 1) und die Zielmutation (*therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit Röhrchen 6) getestet.

Der beobachtete Prozentsatz korrekter Mutationsbestimmungen für gültige Wild-type-(Wildtyp-) Proben betrug 100 %; ein Nachweis, dass keine Kreuzkontamination der Wild-type-(Wildtyp-)

Proben durch mutierte Proben im Rahmen einer gleichzeitigen DNA-Extraktion und Laufvorbereitung erfolgt ist.

Genauigkeit: Vergleich mit der analytischen Referenzmethode (Gewebespezimen)

Zur Demonstration der Genauigkeit des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits verglichen mit einem validierten NGS-Assay wurde eine Genauigkeitsstudie durchgeführt. Dazu wurden klinische FFPE-Spezimen aus Brustkrebspatienten, welche zufällig aus der SOLAR-1-Studie ausgewählt wurden und für die ausreichend Spezimen für die zusätzliche Untersuchung mit dem NGS-Vergleichsassay zur Verfügung stand, untersucht. Von diesen 453 klinischen Spezimen erfüllten 385 die Anforderungen an Gewebevolumen und Tumorgehalt für das NGS-Vergleichsspezimen, und für 379 ergab das NGS ein gültiges Ergebnis.

Proben, die sowohl beim NGS als auch mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit gültige Ergebnisse lieferten, wurden mit dem NGS als Referenz analysiert, um die prozentuale positive Übereinstimmung (positive percent agreement, PPA), die prozentuale negative Übereinstimmung (negative percent agreement, NPA) und die prozentuale Gesamtübereinstimmung (overall percent agreement, OPA) zu bestimmen. Die dabei erhaltenen Prozentsätze sind zusammen mit den zweiseitigen 95%-Konfidenzintervallen (KI), berechnet gemäß der exakten Clopper-Pearson-Methode, in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13. Analyse der Übereinstimmung für FFPE-Gewebespezimen

Maß	Prozentuale Übereinstimmung (N)	Zweiseitiges 95%-KI
Prozentuale positive Übereinstimmung	99,0 (197/199)	96,4, 99,9
Prozentuale negative Übereinstimmung	90,0 (162/180)	84,7, 94,0
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	94,7 (359/379)	92,0, 96,7

Die insgesamt 20 Ergebnisse mit widersprüchlichem Mutationsstatus setzten sich aus zwei Proben mit gemäß *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit negativen und gemäß NGS positiven

Ergebnissen sowie 18 gemäß *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit positiven und gemäß NGS negativen Ergebnissen zusammen. Für beide Proben mit gemäß *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit negativen und gemäß NGS positiven Ergebnissen wurden diese positiven Ergebnisse durch das NGS bei MAF-Werten unterhalb der LoD des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits bestimmt. Von den 18 Proben, die mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit als positiv und mittels NGS als negativ bestimmt wurden, waren 11 niedrig-positiv (innerhalb eines ΔC_T des für das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit verwendeten Cut-offs und damit niedrig-positive Proben). In einem Fall wurde eine Mutation durch das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit als H1047L (3140A>T), durch den NGS-Assay jedoch als H1047I (3139_3140CA>AT) bestimmt. Die Ursache für die sechs übrigen widersprüchlichen Ergebnisse konnte nicht identifiziert werden.

Tabelle 14 zeigt die PPA der Zielsequenz mit NGS als orthogonaler Methode.

Tabelle 14. Analyse der Übereinstimmung für FFPE-Gewebespezimen nach spezifischer Mutation

Mutation*	Prozentuale positive Übereinstimmung (N)	Zweiseitiges 95%-KI
C420R	100,0 (4/4)	39,8, 100,0
E542K	100,0 (27/27)	87,2, 100,0
E545G	100,0 (3/3)	29,2, 100,0
E545K	100,0 (49/49)	92,7, 100,0
E545A	100,0 (2/2)	15,8, 100,0
Q546E	100,0 (1/1)	2,5, 100,0
Q546R	50,0 (1/2)	1,3, 98,7
H1047L	100,0 (12/12)	73,5, 100,0
H1047R	98,1 (101/103)	93,2, 99,8

* Alle 11 PIK3CA-Mutationen wurden im Rahmen der SOLAR-1-Studie in Gewebespezimen nachgewiesen (Tabelle 15).

Klinische Leistungsmerkmale: Gewebespezimen

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist als unterstützender Diagnosetest vorgesehen, der Ärzten die Identifizierung von Brustkrebspatienten, für die eine Behandlung mit PIQRAY (Alpelisib) in Frage kommen kann, erleichtern soll. Als Grundlage dient der Nachweis einer oder mehrerer *PIK3CA*-Mutationen in klinischen FFPE-Gewebespezimen aus Brustkrebs.

Klinische Ergebnisse

Die SOLAR-1-Studie, CBYL719C2301, war eine randomisierte, placebokontrollierte, internationale, multizentrische klinische Phase-III-Doppelblindstudie zur Untersuchung der Wirksamkeit und Sicherheit der Behandlung mit PIQRAY (Alpelisib) plus Fulvestrant im Vergleich mit Placebo plus Fulvestrant bei Männern und postmenopausalen Frauen mit HR-positivem, HER2-negativem fortgeschrittenem Brustkrebs, der auch bei oder nach Behandlung mit Aromatasehemmern weiter fortgeschritten ist. Insgesamt nahmen an der Studie 572 Brustkrebspatienten in zwei Kohorten teil, teilweise mit einer *PIK3CA*-Mutation. Die Patienten wurden randomisiert und erhielten entweder PIQRAY (Alpelisib) 300 mg plus Fulvestrant oder Placebo plus Fulvestrant im Verhältnis 1:1. Die Randomisierung wurde nach dem Vorliegen von Lungen- und/oder Lebermetastasen und der vorherigen Behandlung mit CDK4/6-Inhibitor(en) stratifiziert.

Primärer Endpunkt der Studie war das progressionsfreie Überleben (progression-free survival, PFS) unter Verwendung der Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST v1.1), basierend auf der Untersuchung von Patienten mit fortgeschrittenem Brustkrebs und vorhandener *PIK3CA*-Mutation durch einen Prüfer. Weitere sekundäre Endpunkte waren das PFS für Patienten ohne *PIK3CA*-Mutation sowie das Gesamtüberleben (overall survival, OS), die Gesamtansprechrate (overall response rate, ORR) und die Rate des klinischen Nutzens (clinical benefit rate, CBR) nach *PIK3CA*-Kohorte (d. h. mit oder ohne *PIK3CA*-Mutation).

Der *PIK3CA*-Mutationsstatus für das Screening der Patienten und ihre Aufnahme in die Studie wurde zentral anhand eines Assays im Rahmen der klinischen Studie (clinical trial assay, CTA) oder des QIAGEN *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits ermittelt. Getestet wurden FFPE-Tumorspezimen aus Brustkrebsgewebe. Von den 572 in SOLAR-1 randomisierten Patienten wurden 177 Patienten

(30,9 % der Studienpopulation, darunter 172 *PIK3CA*-mutationspositive und fünf *PIK3CA*-mutationsnegative Patienten) anhand des *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kits randomisiert. Alle übrigen Patienten (395) wurden anhand des CTA randomisiert (69,1 % der Studienpopulation, darunter 169 *PIK3CA*-mutationspositive und 226 *PIK3CA*-mutationsnegative Patienten).

PIQRAY (Alpelisib) in Kombination mit Fulvestrant zeigte sich gemäß Bewertung durch den Prüfer anhand von RECIST 1.1 in der *PIK3CA*-Mutationskohorte für den primären Endpunkt des PFS der alleinigen Behandlung mit Fulvestrant überlegen. Für die Behandlung mit PIQRAY (Alpelisib) plus Fulvestrant wurde ein um schätzungsweise 35 % verringertes Risiko für ein Fortschreiten der Krankheit bzw. Sterberisiko gegenüber der Behandlung mit Placebo plus Fulvestrant beobachtet (Hazard-Ratio [HR] = 0,65; 95%-KI: 0,50, 0,85; $p = 0,0013$, basierend auf zweiseitigem stratifiziertem Log-Rank-Test). Das mediane PFS wurde um klinisch relevante 5,3 Monate verlängert, von 5,7 Monaten im Placebo-plus-Fulvestrant-Arm auf 11,0 Monate im PIQRAY(Alpelisib)-plus-Fulvestrant-Arm (Abbildung 20).

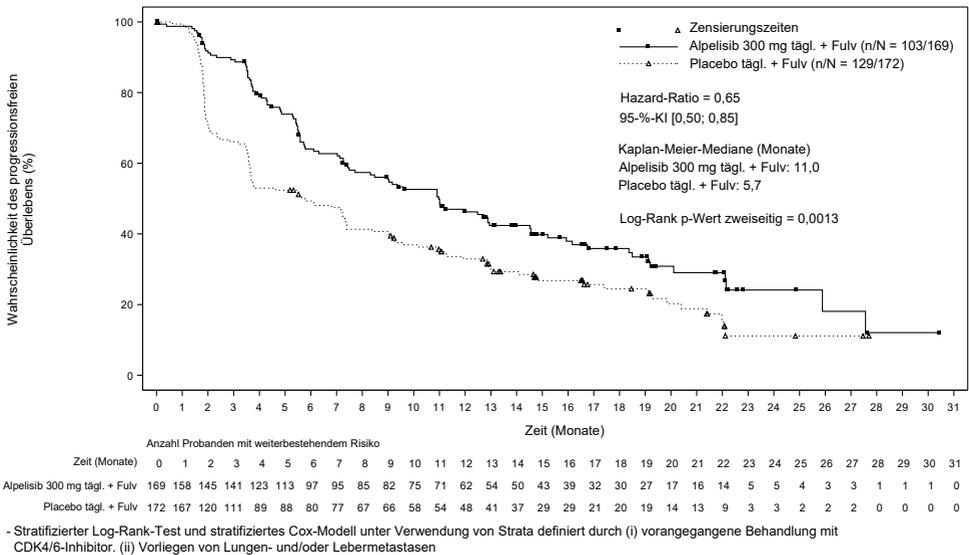


Abbildung 20. Kaplan-Meier-Plot des PFS nach Art der Behandlung in den in SOLAR-1 randomisierten Patienten mit *PIK3CA*-Mutation.

Proben der 395 mittels CTA randomisierten Patienten wurden nachträglich mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit getestet. 389 Proben (98,5 %) konnten mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ausgewertet werden; sechs Patientenproben waren mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit nicht auswertbar (Tabelle 16).

Tabelle 15. Prävalenz der mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit nachgewiesenen *PIK3CA*-Mutationen in Gewebespezimen in der klinischen SOLAR-1-Studie

Exon	Mutation*	COSMIC ID [†]	Basenaustausch	Häufigkeit in FFPE-Gewebespezimen N = 374 (%)
7	C420R	757	1258 T>C	6 (1,6)
9	E542K	760	1624 G>A	66 (17,6)
	E545A	12458	1634 A>C	4 (1,1)
	E545D	765	1635 G>T	6 (1,6)
	E545G	764	1634 A>G	9 (2,4)
	E545K	763	1633 G>A	91 (24,3)
	Q546E	6147	1636 C>G	1 (0,3)
	Q546R	12459	1637 A>G	2 (0,5)
20	H1047L	776	3140 A>T	24 (6,4)
	H1047R	775	3140 A>G	160 (42,8)
	H1047Y	774	3139 C>T	5 (1,3)

* Ein *PIK3CA*-mutationspositiver Patient kann mehr als nur eine Mutation aufweisen.

[†] COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

N = Anzahl der anhand von FFPE-Gewebespezimen identifizierten *PIK3CA*-mutationspositiven Patienten in SOLAR-1.

Tabelle 16. Verteilung der nachträglich erneut getesteten (per CTA aufgenommenen) Probanden (vollständige Analyse, per CTA aufgenommen)

Ergebnisse des <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kits	CTA-positiv (N = 169)	CTA-negativ (N = 226)	Gesamt (N = 395)
Valid (Gültig)	169 (100,0 %)	220 (97,3 %)	389 (98,5%)
Positive (Positiv)	164 (97,0 %)	11 (4,9 %)	175 (44,3 %)
Negative (Negativ)	5 (3,0 %)	209 (92,5 %)	214 (54,2 %)
Invalid (Ungültig)	0 (0 %)	6 (2,7 %)	6 (1,5 %)

Zur Untersuchung der Konkordanz zwischen CTA und *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wurden die Konkordanzindizes PPA, NPA und OPA zusammen mit den entsprechenden zweiseitigen exakten 95%-Konfidenzintervallen nach Copper-Pearson berechnet.

Tabelle 17 zeigt die mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit auswertbare Teilgruppe, wobei der CTA als Referenz verwendet wurde. Zu erkennen ist ein hoher Grad der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des CTA und des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits.

In Tabelle 18 dient die mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit auswertbare Teilgruppe als Referenz. Zu erkennen ist auch hier ein hoher Grad der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des CTA und des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits.

Tabelle 17. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit versus CTA (mit CTA als Referenz)

Maß für die Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung, %	Zweiseitiges 95%-KI
Prozentuale positive Übereinstimmung (Positive percent agreement, PPA)	97,0	93,2, 99,0
Prozentuale negative Übereinstimmung (Negative percent agreement, NPA)	95,0	91,2, 97,5
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (Overall percent agreement OPA)	95,9	93,4, 97,6

Tabelle 18. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit versus CTA (mit *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit als Referenz)

Maß für die Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung, %	Zweiseitiges 95%-KI
Prozentuale positive Übereinstimmung (Positive percent agreement, PPA)	93,7	89,0, 96,8
Prozentuale negative Übereinstimmung (Negative percent agreement, NPA)	97,7	94,6, 99,2
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (Overall percent agreement OPA)	95,9	93,4, 97,6

Tabelle 19 zeigt die neu berechneten Schätzwerte für PPA, NPA und OPA zum Ausgleich der Anreicherung aufgrund der sechs für das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit fehlenden Ergebnisse für die gemäß CTA mutationsnegativen Patienten.

Tabelle 19. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit versus CTA (mit *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit als Referenz)

Maß für die Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung, %	Zweiseitiges 95%-KI
Prozentuale positive Übereinstimmung (Positive percent agreement, PPA)	93,6	90,1, 97,0
Prozentuale negative Übereinstimmung (Negative percent agreement, NPA)	97,7	95,6, 99,5
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (Overall percent agreement OPA)	95,9	93,8, 97,8

Die primäre PFS-Analyse für den klinischen Nutzen des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits ergab eine mit den Ergebnissen der SOLAR-1-Studie vergleichbare klinische Wirksamkeit. Eine Analyse der gemäß *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit mutationspositiven Patientengruppe (347 Patienten) ergab für Patienten, die randomisiert dem PIQRAY(Alpelisib)-plus-Fulvestrant-Arm zugewiesen wurden, ein um schätzungsweise 36 % verringertes Risiko für ein Fortschreiten der Krankheit bzw. Sterberisiko (HR = 0,64; 95%-KI: 0,48, 0,85) verglichen mit den randomisiert dem Placebo-plus-Fulvestrant-Arm zugewiesenen Patienten.

In Empfindlichkeitsanalysen wurden die Auswirkungen der für das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit fehlenden Daten auf das PFS untersucht; die Ergebnisse erwiesen sich trotz der fehlenden Daten als robust. Wenn beispielsweise angenommen wird, dass die sechs für das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit fehlenden Ergebnisse den CTA-Ergebnissen widersprechen würden, ergäbe sich für die gemäß *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit mutationspositiven Patienten, die randomisiert dem PIQRAY(Alpelisib)-plus-Fulvestrant-Arm zugewiesen wurden, ein um schätzungsweise 37 % verringertes Risiko für ein Fortschreiten der Krankheit bzw. Sterberisiko (HR = 0,63; 95%-KI [0,47, 0,84] verglichen mit den randomisiert dem Placebo-plus-Fulvestrant-Arm zugewiesenen Patienten.

Für alle per CTA aufgenommenen mutationspositiven Patienten war eine Auswertung mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit möglich und nur für sechs der per CTA aufgenommenen mutationsnegativen Patienten war eine Auswertung mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit nicht möglich. Dementsprechend gab es keine Verzerrung der Ergebnisse aufgrund der Auswertbarkeit der Studienproben.

Das PFS wurde auch in der gemäß *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit negativen Population geschätzt; für diese Patienten konnte kein PFS-Nutzen festgestellt werden (HR = 0,85; 95%-KI: 0,58; 1,25).

Leistungsmerkmale: Plasmaspezimen

Analytische Leistung: Plasmaspezimen

Die speziellen Leistungsmerkmale des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wurden bestimmt in Studien mit klinischen Plasmaspezimen von Brustkrebspatienten, künstlichen Plasmaspezimen aus Plasma gesunder Spender (GS), das mit Zelllinien-DNA von 11 humanen Zelllinienspezimen versetzt wurde, in denen bekanntermaßen die vom Assay erkannten *PIK3CA*-Mutationen vorliegen, und einem *PIK3CA*-Wild-type (Wildtyp-)Zelllinienspezimen (d. h. ohne eine der Mutationen in Exon 7, 9 und 20, die laut Assay-Spezifikation mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit nachgewiesen werden können).

Leerwertgrenze (LoB): Plasmaspezimen

Die Leerwertgrenze (limit of blank, LOB) ist in der CLSI-Richtlinie EP17-A2 definiert als „das höchste Messergebnis, von dem anzunehmen ist, dass es in Leerproben (mit einer angegebenen Wahrscheinlichkeit) beobachtet werden kann“. Beim *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist dies der Datenpunkt, der dem oberen 95. Perzentil für die Leerproben entspricht. Um die Leistung des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit in Abwesenheit von Template zu beurteilen und sicherzustellen, dass eine Probe mit Wild-type-(Wildtyp-)DNA kein analytisches Signal ergibt, das auf eine in niedriger Konzentration vorhandene Mutation hinweist, wurden insgesamt 60 verschiedene GS-Plasmaspezimen mit seriell verdünnter, fragmentierter *PIK3CA*-Wild-type (Wildtyp-)DNA in sechs Ausgangskonzentrationen versetzt und nach CLSI-Richtlinie EP17-A2 in Dreifachbestimmungen getestet, um die LoB für die einzelnen Mutations-Assays zu ermitteln. Alle Mutations-Assays ergaben einen LoB-Wert, der über dem Cut-off-Wert für die jeweilige Mutante lag. Die LoB-Werte der *PIK3CA*-Mutanten, die mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit in Plasmaspezimen nachgewiesen werden können, sind nachstehend aufgeführt (Tabelle 20).

Tabelle 20. Zusammenfassung der LoB-Ergebnisse

Exon	Mutation	Basenaustausch	LoB (ΔC_T -Wert)	Falsch-positiv-Rate (%)
7	C420R	1258T>C	11,15	0 %
9	E542K	1624G>A	8,32	0 %
	E545A	1634A>C	15,82	0 %
	E545D	1635G>T	9,13	0 %
	E545G	1634A>G	13,39	0 %
	E545K	1633G>A	15,74	0 %
	Q546E	1636C>G	15,82	0 %
	Q546R	1637A>G	10,19	0,56 %
20	H1047L	3140A>T	15,55	0,56 %
	H1047R	3140A>G	11,93	0 %
	H1047Y	3139C>T	9,89	0 %

Nachweisgrenze (LoD): Plasmaspezimen

Es wurde eine Studie mit künstlichen Plasmaspezimen zur Bestimmung der Nachweisgrenze (limit of detection, LoD) für jede der 11 *PIK3CA*-Mutationen durchgeführt. Die LoD war definiert als die niedrigste Menge an mutierter DNA vor einem Hintergrund von Wild-type-(Wildtyp-) DNA, bei der eine Probe mit einer Mutante bei 95 % der Tests noch ein mutationspositives Resultat ergibt (C_{95}).

Zur Bestimmung der LoD für die einzelnen Mutationen wurden Proben mit unterschiedlichen Prozentsätzen an mutierter DNA bei niedriger DNA-Ausgangskonzentration hergestellt und mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit getestet (siehe Tabelle 21). Die LoD für die einzelnen Assays wurde mithilfe eines „Probit-Verfahren“ berechnet. Die LoD für 11 künstliche Mutanten-Proben wurde mithilfe dreier verschiedener Chargen des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits in 24 Wiederholungsbestimmungen pro Kit und Konzentration bestimmt. Bei einer Untergruppe der Mutationen wurde das Ergebnis anhand von klinischen Plasmaproben im Bereich der ermittelten LoD verifiziert.

Tabelle 21. LoD für Plasmaspezimen, ermittelt anhand von klinischen und künstlichen Plasmaspezimen mit niedriger DNA-Ausgangsmenge

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basenaustausch	LoD, % MAF
7	C420R	757	1258T>C	4,46 [†]
9	E542K	760	1624G>A	5,06 ^{††}
	E545A	12458	1634A>C	1,82 [†]
	E545D	765	1635G>T	3,21 [†]
	E545G	764	1634A>G	1,94 ^{††}
	E545K	763	1633G>A	2,42 ^{††}
	Q546E	6147	1636C>G	5,31 [†]
	Q546R	12459	1637A>G	4,22 [†]
	20	H1047L	776	3140A>T
H1047R		775	3140A>G	1,98 ^{††}
H1047Y		774	3139C>T	7,07 [†]

MAF: Mutant allele frequency (Frequenz mutierter Allele).

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

[†] Die LoD-Werte wurden unter Verwendung von Zelllinienspezimen bestimmt.

^{††} Die LoD-Werte wurden unter Verwendung von klinischen Plasmaspezimen bestätigt.

Ausgangsmengen genomischer DNA: Plasmaspezimen

Der C_T-Arbeitsbereich wurde anhand von berechneten Toleranzintervallen und LoB-Werten festgelegt. Der C_T-Arbeitsbereich für den Kontroll-Assay wurde anhand von 30 verschiedenen 10-ml-Wild-type-(Wildtyp-)Proben bestimmt, die unterschiedliche Konzentrationen der Wild-type-(Wildtyp-)DNA enthielten (120 Beobachtungen). Der C_T-Arbeitsbereich des endgültigen Kontroll-Assays wurde bei C_T-Werten von 24,69 bis 31,68 festgelegt, was einem Konfidenzintervall von 98 % für 95 % der vorgesehenen Zielpopulation entspricht.

ΔC_T -Cut-off-Werte: Plasmaspezimen

Die Cut-off-Werte für die einzelnen Mutationen wurden mithilfe künstlicher Plasmaspezimen ermittelt. Bei der Festlegung akzeptabler Cut-off-Werte wurden über statische Analysen der ΔC_T -Werte hinaus LoB-Werte und Designanforderungen hinsichtlich der Raten falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse berücksichtigt.

Die ermittelten Cut-off-Werte sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22. Für die einzelnen Mutationen festgelegte Cut-off-Werte beim Test von DNA aus Plasmaspezimen

Assay	Cut-off-Wert (ΔC_T)
C420R	$\leq 6,0$
E542K	$\leq 4,8$
E545A	$\leq 10,0$
E545D	$\leq 7,0$
E545G	$\leq 9,5$
E545K	$\leq 10,0$
Q546E	$\leq 10,0$
Q546R	$\leq 7,0$
H1047L	$\leq 10,0$
H1047R	$\leq 9,0$
H1047Y	$\leq 6,2$

Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_T -Werte (Linearität): Plasmaspezimen

Die DNA-Ausgangsmenge ist definiert als die Gesamtmenge amplifizierbarer-DNA in einer Probe, bestimmt anhand der C_T -Werte der *PIK3CA*-Kontrollreaktion. Um zu zeigen, dass die Leistung des *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit über den gesamten C_T -Bereich der Kontrollreaktion (24,69 bis 31,68) hinweg konsistent ist, wurde für jede der 11 *PIK3CA*-Mutation-Assays eine 8-stufige Verdünnungsreihe hergestellt (fragmentierte, aus Zelllinienspezimen extrahierte DNA). Die C_T -Zielwerte der einzelnen Mutationen für die Verdünnungsstufen 1 und 8 wurden so festgelegt, dass sie über und unter dem C_T -Wert der Kontrollreaktion liegen. Die ΔC_T -Werte bei unterschiedlichen DNA-Gesamtausgangsmengen waren über den Arbeitsbereich des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits für die Mutationen insgesamt konsistent.

Assay-Spezifität (Kreuzreaktivität/Spezifität): Plasmaspezimen

Um zu prüfen, ob Kreuzreaktivität zwischen den durch den Assay nachgewiesenen Mutationen bei der Festlegung der Cut-off-Werte für die Analyse korrekt berücksichtigt wurden, wurden mutationspositive künstliche Plasmaspezimen mit hoher und niedriger DNA-Ausgangsmenge auf hohe und niedrige MAF-Zielwerte verdünnt und in Doppelbestimmungen mit drei Chargen des *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit getestet. Kreuzreaktivität wurde zwischen dem H1047L- und dem H1047R-Assay beobachtet. Es wurde jedoch festgestellt, dass diese Kreuzreaktivität unidirektional ist (d. h., wenn in einer Probe H1047L und H1047R nachgewiesen werden, wird dies nur als „H1047R Mutation Detected“ (H1047R-Mutation nachgewiesen)) angegeben. Diese Regel ist Bestandteil des automatisierten Algorithmus des „*therascreen* *PIK3CA*_Plasma Assay Profile“.

Störungen: Plasmaspezimen

Endogene Substanzen

Mögliche Störsubstanzen, die in den Plasmaspezimen vorliegen können, wurden in künstlichen Proben mit Mutanten und Wild-type (Wildtyp) getestet, wobei sich deren Konzentrationen an der CLSI-Richtlinie EP7-A2 orientierten:

- Hämoglobin (2 g/l)
- Triglyzeride (37 mmol/l)
- EDTA (3,4 µmol/l)
- Koffein (308 µmol/l)
- Albumin (30 mg/ml)
- Konjugiertes Bilirubin (342 µmol/l)
- Unkonjugiertes Bilirubin (342 µmol/l)

Die Ergebnisse zeigten, dass diese Substanzen die Resultate des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit nicht beeinträchtigten.

Exogene Substanzen

Mögliche exogene Störsubstanzen aus dem DNA-Extraktionsprozess wurden in Proben mit Mutanten und Wild-type (Wildtyp) getestet, wobei eine Verschleppung aus dem Extraktionsprozess von 10 % angenommen wurde:

- Ethanol
- Proteinase K
- Buffer ACL
- Buffer ACB
- Buffer ACW1
- Buffer ACW2

Die Ergebnisse zeigten, dass diese Substanzen die Resultate des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit nicht beeinträchtigten.

Austauschbarkeit der Chargen: Plasmaspezimen

Für Tests mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR System werden das QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit zur Extraktion von DNA und das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit zur Amplifikation der DNA und die Bestimmung des *PIK3CA*-Mutationsstatus verwendet. Die Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit und -Austauschbarkeit wurde anhand von drei Chargen des QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit und einer Charge des *therascreen* PIK3CA PCR Kit nachgewiesen. Der Gesamtprozentsatz korrekter Ergebnisse für alle mutationspositiven und Wild-type-(Wildtyp)-Proben über die Chargen hinweg betrug 100%.

Handhabung der Spezimen: Plasmaspezimen

Um zu zeigen dass verschiedene Labore akzeptable Ergebnisse produzieren können, wenn sie mit demselben Plasmaspezimen starten, wurden Extraktionen an drei verschiedenen Standorten durchgeführt. Es wurden künstliche Spezimen für alle 11 Mutationen sowie ein klinisches Plasmaspezimen mit *PIK3CA*-Wilde-type (Wildtyp) verwendet. Es wurden 18 x 2-ml-Aliquote aller Spezimen vorbereitet, anschließend randomisiert und in 18 Extrakt-Sets aufgeteilt wurden. Diese Extrakt-Sets wurden gleichmäßig über die drei Standorte verteilt (ein interner QIAGEN-Standort im Vereinigten Königreich und zwei weitere externe Standorte in den USA). Jeder Standort erhielt also sechs Extrakte. Der Test der aus den Spezimen-Aliquoten extrahierten DNA mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit erfolgte am internen QIAGEN-Standort. Beim Vergleich der Ergebnisse für die verschiedenen Spezimen über alle drei Standorte hinweg ergab sich ein Prozentsatz korrekter Bestimmungen der für *PIK3CA*-Mutationen positiven und Wilde-type-(Wildtyp)-Spezimen von 100%.

Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit: Plasmaspezimen

Die mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit erzielbare Wiederholbarkeit wurde anhand von DNA untersucht, die aus Zelllinienspezimen extrahiert wurde, welche alle 11 mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit nachzuweisenden Mutationen bei einer Konzentration von 1x LoD und 3x LoD repräsentierten.

Die Wiederholbarkeit wurde beurteilt, indem diese Proben an einem Standort über 20 nicht aufeinander folgende Tage von drei Bedienern mit drei Rotor-Gene Q Geräten getestet wurden, was eine Gesamtanzahl von 120 Wiederholungsbestimmungen je Probe ergab (Tabelle 23).

Tabelle 23. Assay-Wiederholbarkeit – Anteil korrekter Bestimmungen von *PIK3CA*-Mutationen in aus Plasmaspezimen gewonnenen DNA-Proben

Exon	Mutation	Mutationsrate	Anteil gültiger Ergebnisse	Korrekte Bestimmungen, %	Untergrenze zweiseitiges 95%-KI
n. z.	Wildtyp	C _r 30	114/120	95,00	89,43
7	C420R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
9	E542K	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E542A	LoD	119/120	99,17	95,44
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545D	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545G	LoD	119/120	99,17	95,44
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545K	LoD*	111/120	92,50	86,24
		3x LoD*	120/120	100,00	96,97
	Q546E	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
Q546R	LoD*	115/120	95,83	90,54	
	3x LoD*	120/120	100,00	96,97	
20	H1047L	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047R	LoD	110/120	91,67	85,21
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047Y	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97

* Die LoD für E545K und H1047R betrug 1,99 bzw. 1,44. Die LoD wurde in einer darauf folgenden Studie neu angepasst und bestätigt. Die neu angepasste LoD wurde in der nachfolgenden Studie verwendet (Tabelle 24).

Die Reproduzierbarkeit wurde durch Testen künstlicher Proben mit Konzentrationen von 1x LoD und 3x LoD an drei verschiedenen Standorten (ein interner QIAGEN-Standort im Vereinigten Königreich und zwei weitere externe Standorten in den USA) gemessen. Diese Proben wurden an jedem Standort über 10 nicht aufeinander folgende Tage von drei Bedienern mit drei Rotor-Gene Q Geräten getestet, was eine Gesamtanzahl von 60 Wiederholungsbestimmungen je Probe ergab (Tabelle 24).

Tabelle 24. Assay-Reproduzierbarkeit – Anteil korrekter Bestimmungen von *PIK3CA*-Mutationen in aus Plasmaspezimen aller Standorte gewonnenen DNA-Proben

Exon	Mutation	Mutationsrate	Anteil gültiger Ergebnisse	Korrekte Bestimmungen, %	Untergrenze zweiseitiges 95%-KI
n. z.	WT	C:30	223/238	93,70	89,82
7	C420R	LoD	237/238	99,58	97,68
		3x LoD	238/238	100,00	98,46
9	E542K	LoD	237/240	98,75	96,39
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545A	LoD	239/240	99,58	97,70
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545D	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545G	LoD	237/240	98,75	96,39
		3x LoD	239/239	100,00	98,47
	E545K	LoD*	432/432	100,00	99,15
		3x LoD	240/240	100,00	89,47
Q546E	LoD	238/238	100,00	98,46	
	3x LoD	238/238	100,00	98,46	
Q546R	LoD*	232/240	96,67	93,54	
	3x LoD	240/240	100,00	98,47	
20	H1047L	LoD	236/238	99,16	97,00
		3x LoD	238/238	100,00	98,46
	H1047R	LoD	430/432	99,54	98,34
		3x LoD	236/236	100,00	98,45
	H1047Y	LoD	239/240	99,58	97,70
		3x LoD	240/240	100,00	98,47

* Proben mit E545K und H1047R beim revidierten LoD-Wert (gemäß Tabelle 21) wurden an drei Standorten von drei Bedienern über sechs Tage getestet, wobei zwei Läufe mit vier Wiederholungsbestimmungen durchgeführt wurden, insgesamt also 144 Messungen pro Standort und 432 an allen drei Standorten zusammen. Tabelle 25 zeigt die prozentuale positive Übereinstimmung (positive percentage agreement, PPA) der Zielsequenz mit NGS als orthogonale Methode.

Die Standardabweichung für die Inter-Kit-, Inter-Lauf-, Inter-Anwender-, Inter-Instrument-, Inter-Tag- und Intra-Lauf-Variabilität wurde anhand einer Varianzkomponentenanalyse bestimmt, um Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit zu ermitteln. Über alle Varianzkomponenten hinweg betrug die Standardabweichung (standard deviation, SD) $\leq 1,34 \Delta C_T$ für 1x LoD und $\leq 0,73 \Delta C_T$ für 3x LoD bei allen *PIK3CA*-Mutationen, die im Reproduzierbarkeitstest untersucht wurden. Über alle Vertreter des Mutationen-Panels hinweg betrug die SD $\leq 0,20 \Delta C_T$ für 1x LoD und $\leq 0,10 \Delta C_T$ für 3x LoD von Charge zu Charge (Chargen-Austauschbarkeit). Die SD für die Variabilität innerhalb eines Laufs (Wiederholbarkeit/Präzision) reichte von $0,415 \Delta C_T$ bis $1,407 \Delta C_T$ für 1x LoD und $0,206 \Delta C_T$ bis $0,583 \Delta C_T$ für 3x LoD.

Validierung von Blutentnahmeröhrchen

Der Einfluss der Blut-Plasma-Trennzeit auf die Qualität des Plasmaspezimens und die anschließend erhaltenen Ergebnisse wurde mithilfe künstlicher Blutproben mit der Mutation H1047R (Mutation mit der höchsten Prävalenz) sowie Vollblutproben von gesunden Freiwilligen als Wild-type-(Wildtyp-)Spezimen untersucht. Blutspezimen von vier Spendern wurden in 10-ml-K₂EDTA-Röhrchen gesammelt (acht Röhrchen pro Spender). Künstliche Blutspezimen wurden hergestellt, indem Blutröhrchen von zwei Spendern nach der Entnahme mit fragmentierter DNA versetzt wurden, die aus einer Zelllinie mit der *PIK3CA*-Mutation H1047R gewonnen worden war. Aus den Blutspezimen wurde etwa 1, 2, 3 und 4 Stunden nach der Entnahme Plasma präpariert. Aus den Plasmaspezimen wurde mit dem QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit DNA extrahiert und jede Zielsequenz wurde in 16 Wiederholungsbestimmungen mit dem *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit getestet.

Alle getesteten Proben lieferten bei allen Zeitpunkten korrekte Ergebnisse. Des Weiteren wurde keine statistisch signifikante Drift hinsichtlich des für die *PIK3CA*-Mutante H1047R gemessenen ΔC_T -Werts beobachtet.

Diese Studie zeigte, dass die Blut-Plasma-Trennzeit keinen Einfluss auf die mit dem *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit erhaltenen Ergebnisse hat, wenn das Blut innerhalb von vier Stunden verarbeitet wird.

Genauigkeit: Vergleich mit einer analytischen Referenzmethode (Plasmaspezimen)

Um die Genauigkeit der mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit erhaltenen Ergebnisse zu demonstrieren, wurde dieser in einer Studie mit Spezimen aus der klinischen Studie SOLAR-1 mit einem validierten NGS-Assay verglichen. Der Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit und dem NGS-Verfahren auf *PIK3CA*-Veränderungen wurde mit DNA von 552 klinischen Plasmaspezimen aus der klinischen Studie SOLAR-1 durchgeführt.

DNA-Proben, die sowohl bei der NGS als auch mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit gültige Ergebnisse lieferten (542/552 Proben), wurden analysiert, um die positive prozentuale Übereinstimmung (Positive Percent Agreement, PPA), die negative prozentuale Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA) und die prozentuale Gesamtübereinstimmung (Overall Percent Agreement, OPA) zu ermitteln. Die entsprechenden Prozentsätze sind zusammen mit den zweiseitigen 95%-Konfidenzintervallen (KI) in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25. Analyse der Übereinstimmung bei aus Plasmaspezimen erhaltenen DNA-Proben

Maß	Prozentuale Übereinstimmung (N)	Unteres 95%-KI
Prozentuale positive Übereinstimmung	97,39 (149/153)	93,44
Prozentuale negative Übereinstimmung	91,26 (355/389)	88,00
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	92,99 (504/542)	90,50

Von den 38 nicht übereinstimmenden Ergebnissen der Gesamtübereinstimmungs-Studie:

- stammten vier (0,7 %) von Proben, für die das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit das Ergebnis Wild-type (Wildtyp) (d. h. „No Mutation detected (keine Mutation nachgewiesen)), die NGS aber das Ergebnis „Mutation detected“ (Mutation nachgewiesen) lieferte.

- stammten 34 (6,3 %) von Proben, für die das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit das Ergebnis „Mutation detected“ (Mutation nachgewiesen) die NGS aber das Ergebnis Wildtype (Wildtyp) lieferte.
- Tabelle 26 zeigt die PPA der Zielsequenz mit NGS als orthogonale Methode.

Tabelle 26. Analyse der Übereinstimmung bei aus Plasmaspezimen erhaltenen DNA-Proben nach Mutation

Mutation*	Prozentuale positive Übereinstimmung (N)	Zweiseitiges 95%-KI
C420R	100,0 % (2/2)	15,8; 100,0
E542K	90,9 % (20/22)	70,8; 98,9
E545G	100,0 % (2/2)	15,8; 100,0
E545K	100,0 % (38/38)	90,7; 100,0
H1047L	100,0 % (5/5)	47,8; 100,0
H1047R	97,6 % (83/85)	91,8; 99,7

* Bei der Studie SOLAR-1 wurden 6/11 *PIK3CA*-Mutationen in Plasmaspezimen nachgewiesen (Tabelle 31).

Klinische Leistungsmerkmale: Plasmaspezimen

Das *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ist für die Verwendung als begleitdiagnostischer Test vorgesehen und soll den Arzt bei der Identifizierung von Brustkrebspatienten unterstützen, die, abhängig vom Vorliegen von einer oder mehreren Mutationen des *PIK3CA*-Gens, nachgewiesen in klinischen Plasmaspezimen aus mit K₂EDTA antikoaguliertem peripherem venösem Vollblut, für eine Behandlung mit PIQRAY (Alpelisib) infrage kommen.

Klinische Plasmaspezimen aus mit K₂EDTA antikoaguliertem, peripherem venösem Vollblut, das bei der Studie SOLARIS-1 vor Beginn der Studienbehandlung (Ausgangszeitpunkt) randomisierten Brustkrebspatienten entnommen worden war, wurden retrospektiv mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit getestet, um den klinischen Nutzen dieser Art von Spezimen bei der Bestimmung des *PIK3CA*-Mutationsstatus sowie der Beurteilung der Konkordanz von Ergebnissen, die mit Gewebe und Plasma erhalten wurden, zu bewerten.

Ergebnisse der Konkordanzanalyse

Die Konkordanz zwischen den mithilfe des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit unter Verwendung von Plasma und den mithilfe des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit unter Verwendung von Gewebe erhaltenen Ergebnissen ist in Tabelle 27 dargestellt. Bei 328 Patienten war das Gewebe laut Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit positiv, und bei 179 davon war gemäß dem Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit auch das Plasma positiv. Bei 215 Patienten war das Gewebe laut Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit negativ, und bei 209 davon war gemäß dem Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit auch das Plasma negativ. Alle mit Plasma erhaltenen Ergebnisse waren gültig.

Tabelle 27. Tabellarische Darstellung der Korrespondenz zwischen den mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit Gewebe und PIK3CA RGQ PCR Kit Plasma anhand von Gewebe bzw. Plasma erhaltenen Ergebnissen

<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit Plasma	<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit Gewebe			
	Positiv	Negativ	Ungültig	Insgesamt
Positive (Positiv)	179	6	1	186
Negative (Negativ)	149	209	5	363
Invalid (Ungültig)	0	0	0	0
Insgesamt	328	215	6	549

Die Übereinstimmung (PPA, NPA und OPA) zwischen den mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit Plasma und PIK3CA RGQ PCR Kit Gewebe erhaltenen Ergebnissen wurde berechnet unter Verwendung der mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit Gewebe erhaltenen Ergebnisse als Referenz (Tabelle 28). Die Punktschätzungen für PPA, NPA und OPA lagen bei 55 %, 97 % bzw. 72 %.

Tabelle 28. Übereinstimmung zwischen den mithilfe des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit Plasma bzw. Gewebe erhaltenen Ergebnissen unter Verwendung der mit Gewebe erhaltenen Ergebnisse als Referenz

Maß für die Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (N)	95%-KI*
Prozentuale positive Übereinstimmung	55 % (179/328)	(49,0; 60,1)
Prozentuale negative Übereinstimmung	97 % (209/215)	(94,0; 99,0)
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	72 % (388/543)	(67,5; 75,2)

* 95%-KI, berechnet anhand des exakten Verfahrens nach Clopper-Pearson.

Bestätigungstests mit den Plasmaproben unter Verwendung der validierten Referenzmethode NGS bestätigten 91 % der mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit für Plasma erhaltenen Ergebnisse. Von den Patienten, deren Gewebe beim Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit Gewebe positiv, deren Plasma laut Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit Plasma jedoch negativ war, wurden 80 % der Fälle durch NGS als plasmanegativ bestätigt. Von den sechs diskordanten Fällen, deren Plasma laut Analyse mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit Plasma positiv, deren Gewebe jedoch laut Analyse mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit Gewebe negativ war, wurden fünf durch NGS als plasmapositiv bestätigt.

Analyse des progressionsfreien Überlebens (PFS)

Der Vergleich des PFS unter Behandlung mit PIQRAY (Alpelisib) in Kombination mit Fulvestrant der laut Analyse mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit plasmapositiven Population (N = 185) ergab für den Arm unter PIQRAY (Alpelisib) plus Fulvestrant im Vergleich zum Arm unter Placebo plus Fulvestrant ein günstigeres Ergebnis, bei einer geschätzten Reduktion des Risikos für Krankheitsprogression oder Tod um 46 % (HR = 0,54, 95%-KI: 0,33; 0,88) (Tabelle 29). Im Vergleich dazu betrug das HR für das PFS in der laut Analyse mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit gewebepositiven Population 0,64 (95%-KI: 0,48; 0,85) und 0,65 (95%-KI: 0,50; 0,85) in der Kohorte der SOLAR-1-Studie mit *PIK3CA*-Mutationen gemäß dem bei Aufnahme in die Studie durchgeführten Gewebe-Assay.

Tabelle 29. PFS-Analyse bei laut Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit plasmapositiven Patienten

PFS (N)	HR (95%-KI)
	PIQRAY 300 mg tägl. + Fulv./Placebo tägl. + Fulv.*
Laut <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit plasmapositiv (185)	0,54 (0,33; 0,88)

* HR und 95%-KI berechnet mittels Anreicherungsanpassung.

Das HR für das PFS bei den 179 Patienten, die laut Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit sowohl gewebepositiv als auch plasmapositiv waren, betrug 0,53 (95%-KI: 0,33; 0,84). Das mediane PFS betrug 10,9 Monate für den Arm unter Behandlung mit PIQRAY (Alpelisib) plus Fulvestrant vs. 3,6 Monate für den Arm unter Placebo plus Fulvestrant (Tabelle 30, Abbildung 21).

Tabelle 30. Progressionsfreies Überleben (Monate) bei laut Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit gewebepositiven und plasmapositiven Patienten

Progressionsfreies Überleben	HR (95%-KI)		
	PIQRAY 300 mg tägl. + Fulv. N = 90	Placebo tägl. + Fulv. N = 89	PIQRAY 300 mg tägl. + Fulv./Placebo tägl. + Fulv.
Anzahl Ereignisse (%)	57 (63,3)	72 (80,9)	0,53 (0,33; 0,84)
PD (%)	55 (61,1)	67 (75,3)	–
Tod (%)	2 (2,2)	5 (5,6)	–
Zensierte Anzahl (%)	33 (36,7)	17 (19,1)	–
Median (95%-KI)	10,9 (7,0; 16,2)	3,6 (2,0; 5,8)	–

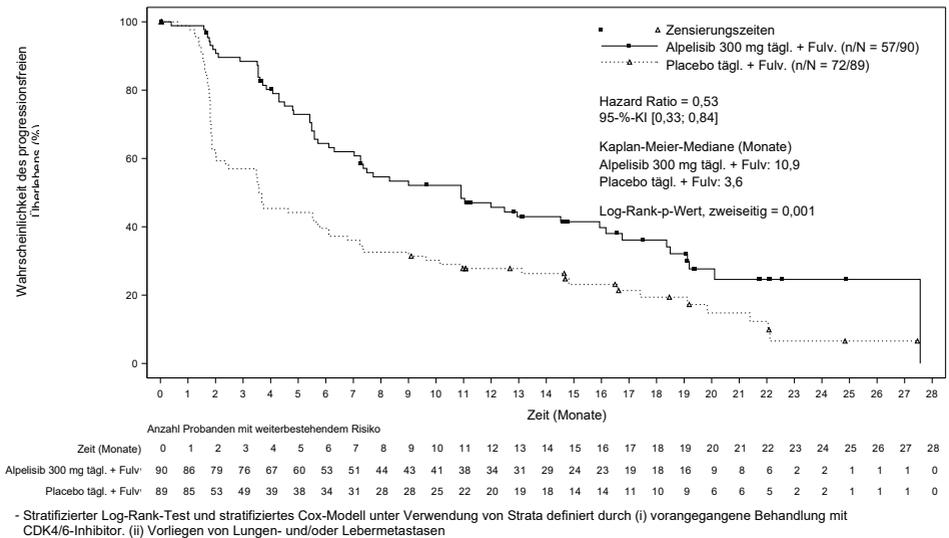


Abbildung 21. Kaplan-Meier-Kurve des PFS je nach Behandlung bei laut Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit gewebepositiven und plasmapositiven Patienten.

Tabelle 31. Prävalenz der mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit nachgewiesenen PIK3CA-Mutationen in Plasmaspezimen aus der klinischen Studie SOLAR-1

Exon	Mutation*	COSMIC ID [†]	Basenaustausch	Häufigkeit in Plasmaspezimen N = 186 (%)
7	C420R	757	1258 T>C	2 (1,1)
9	E542K	760	1624 G>A	22 (11,8)
	E545A	12458	1634 A>C	0 (0,0)
	E545D	765	1635 G>T	0 (0,0)
	E545G	764	1634 A>G	3 (1,6)
	E545K	763	1633 G>A	48 (25,8)
	Q546E	6147	1636 C>G	0 (0,0)
	Q546R	12459	1637 A>G	0 (0,0)
20	H1047L	776	3140 A>T	10 (5,4)
	H1047R	775	3140 A>G	102 (54,8)
	H1047Y	774	3139 C>T	0 (0,0)

* Ein PIK3CA-mutationspositiver Patient kann mehr als nur eine Mutation aufweisen.

[†] COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

N = Anzahl der anhand von Plasmaspezimen identifizierten Patienten mit PIK3CA-Mutation bei der Studie SOLAR-1.

Schlussfolgerungen zu Sicherheit und Wirksamkeit

Die klinische Studie zur Genauigkeit erfüllte die Akzeptanzkriterien für die PPA bei mutationspositiven Proben und für die NPA bei mutationsnegativen Proben und bestätigte damit, dass der *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit sowohl für biomarker-positive als auch biomarker-negative richtige Resultate ergab.

Die Konkordanz der mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit für Plasma und Gewebe erhaltenen Ergebnisse für das NPA lag bei 97 %, was für ein niedriges Risiko falsch positiver Ergebnisse spricht. Ein falsch negatives Ergebnis kann verhindern, dass ein Patient ein potenziell nützliches Medikament erhält. Die PPA bei Plasma- und Gewebeproben betrug 55 %, was darauf hinweist, dass plasmanegative Patienten gewebepositiv für eine PIK3CA-Mutation sein können. Wenn daher das Plasma eines Patienten beim Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ein negatives Resultat für PIK3CA-Mutationen ergibt, sollte zur Bestätigung des PIK3CA-Mutationsstatus ein Gewebespezimen analysiert werden.

Die klinische Wirksamkeit von PIQRAY (Alpelisib) in Kombination mit Fulvestrant bei der laut Test mit dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit für PIK3CA-Mutationen plasmapositiven Population wurde mithilfe des *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit anhand einer Reduktion des Risikos für Krankheitsprogression oder Tod um 46 % gegenüber Placebo plus Fulvestrant nachgewiesen (HR = 0,54, 95%-KI: 0,33; 0,88).

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Internet-Seite „Frequently Asked Questions“ unseres TechniksUPPORT-Zentrums: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Die Wissenschaftler des Technischen Service von QIAGEN helfen Ihnen in allen Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch bzw. zu Proben- und Assay-Technologien gerne weiter (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Statusindikator „No C_T value“ („Kein C_T-Wert“) bei der positiven Kontrolle (Positive Control, PC)

- | | |
|---|---|
| a) Fehlerhafte Konfiguration der PCR | Überprüfen Sie Ihr Pipettierschema und wiederholen Sie die PCR. |
| b) Die Lagerbedingungen einer oder mehrerer Komponenten des Kits entsprachen nicht den Anweisungen in „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 23 | Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie bei Bedarf ein neues Kit. |

Statusindikator „Unexpected C_T value“ („Unerwarteter C_T-Wert“) bei der Kontrolle ohne Template

- | | |
|--|---|
| Kontamination bei Vorbereitung der PCR | Stellen Sie sicher, dass der Vorbereitungsbereich dekontaminiert ist. Wiederholen Sie die PCR mit neuen Reagenzien. Verschließen Sie die PCR-Röhrchen möglichst sofort nach der Zugabe der zu testenden Probe. Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. |
|--|---|

Statusindikator „Above acceptable range“ („Über dem akzeptablen Bereich“) oder „Below acceptable range“ („Unter dem akzeptablen Bereich“) bei der positiven Kontrolle

- | | |
|-------------------------------------|---|
| Fehler bei der Vorbereitung der PCR | Wiederholen Sie die PCR und achten Sie auf genaues Pipettieren. |
|-------------------------------------|---|

Statusindikator „DNA input too high“ („DNA-Ausgangsmenge zu hoch“) beim Probenröhrchen

- | | |
|-------------------------------|---|
| Die Probe ist zu konzentriert | Verdünnen Sie die Probe, um den C _T -Wert zu erhöhen. Die Proben sind mit dem im Kit enthaltenen Wasser zu verdünnen (Wasser zur Verdünnung [Dil.]). |
|-------------------------------|---|

Kommentare und Vorschläge

Statusindikator "Above acceptable range" („Über dem akzeptablen Bereich“) beim Probenröhrchen

Nicht genügend DNA-
Template in der Probe

Gewebespezimen: Wiederholen Sie den Test ein Mal. Wenn das System denselben Statusindikator ein zweites Mal anzeigt, extrahieren Sie die DNA erneut und verwenden Sie zwei Objektträger desselben Spezimen von reseziertem Gewebe bzw. eine ausreichende Anzahl Objektträger bei Stanzbiopsien, um eine Fläche von 20 mm² zu erhalten, und wiederholen Sie die PCR. Wenn das System nach der Re-Extraktion denselben Statusindikator für das Spezimen anzeigt, wiederholen Sie den ein zweites Mal. Wenn der Statusindikator wieder angezeigt wird, ist das Spezimen nicht zur Verwendung geeignet. Es sollte als „indeterminate“ (unbestimmt) erfasst und nicht weiter getestet werden.

Plasmaspezimen: Wiederholen Sie den Test ein Mal. Wenn das System denselben Statusindikator ein zweites Mal anzeigt, extrahieren Sie die DNA erneut und verwenden Sie 2 ml Patientenplasma. Wenn das System nach der Re-Extraktion denselben Statusindikator für das Spezimen anzeigt, ist das Spezimen nicht zur Verwendung geeignet. Sie muss als „indeterminate“ (unbestimmt) erfasst und braucht nicht weiter getestet werden. Ziehen Sie eine Wiederholung des Tests mit einem frischen Blutplasma-Spezimen in Erwägung.

Statusindikator "IC above acceptable range" („Interne Kontrolle über dem akzeptablen Bereich“) beim Probenröhrchen

Fehler bei der Vorbereitung der PCR oder Inhibitor in der Reaktion vorhanden

Gewebespezimen: Wiederholen Sie den Test ein Mal. Wenn das System denselben Statusindikator ein zweites Mal anzeigt, extrahieren Sie die DNA erneut und verwenden Sie zwei Objektträger desselben Spezimen von reseziertem Gewebe bzw. eine ausreichende Anzahl Objektträger bei Stanzbiopsien, um eine Fläche von 20 mm² zu erhalten, und wiederholen Sie die PCR. Wenn das System nach der Re-Extraktion denselben Statusindikator für das Spezimen anzeigt, wiederholen Sie den ein zweites Mal. Wenn der Statusindikator wieder angezeigt wird, ist das Spezimen nicht zur Verwendung geeignet. Sie sollte als „unbestimmt“ erfasst und nicht weiter getestet werden.

Plasmaspezimen: Wiederholen Sie den Test ein Mal. Wenn das System denselben Statusindikator ein zweites Mal anzeigt, extrahieren Sie die DNA erneut und verwenden Sie 2 ml Patientenplasma. Wenn das System nach der Re-Extraktion denselben Statusindikator für die Probe anzeigt, ist die Probe nicht zur Verwendung geeignet. Sie muss als „indeterminate“ (unbestimmt) erfasst und braucht nicht weiter getestet werden. Ziehen Sie eine Wiederholung des Tests mit einem frischen Blutplasma-Spezimen in Erwägung.

Kommentare und Vorschläge

Statusindikator "No C_T value" („Kein C_T-Wert“) bei der T1-Kontrolle (Probe)

Kein amplifizierbares
DNA-Template in der Probe

Gewebespezimen: Wiederholen Sie den Test ein Mal. Wenn das System denselben Statusindikator ein zweites Mal anzeigt, extrahieren Sie die DNA erneut und verwenden Sie zwei Objektträger desselben Spezimen von reseziertem Gewebe bzw. eine ausreichende Anzahl Objektträger bei Stanzbiopsien, um eine Fläche von 20 mm² zu erhalten, und wiederholen Sie die PCR. Wenn das System nach der Re-Extraktion denselben Statusindikator für das Spezimen anzeigt, wiederholen Sie den ein zweites Mal. Wenn der Statusindikator wieder angezeigt wird, ist das Spezimen nicht zur Verwendung geeignet. Es sollte als „indeterminate“ (unbestimmt) erfasst und nicht weiter getestet werden.

Plasmaspezimen: Wiederholen Sie den Test ein Mal. Wenn das System denselben Statusindikator ein zweites Mal anzeigt, extrahieren Sie die DNA erneut und verwenden Sie 2 ml Patientenplasma. Wenn das System nach der Re-Extraktion denselben Statusindikator für das Spezimen anzeigt, ist das Spezimen nicht zur Verwendung geeignet. Sie muss als „indeterminate“ (unbestimmt) erfasst und braucht nicht weiter getestet werden. Ziehen Sie eine Wiederholung des Tests mit einem frischen Blutplasma-Spezimen in Erwägung.

Literatur

1. Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., et al. (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17, 615.
2. Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., et al. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 304, 554.
3. Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 490, 61.
4. National Breast Cancer Foundation (2018). Breast cancer facts. Available at: www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-facts. Accessed: 14 January 2019.
5. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* 68, 7.
6. Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., et al. (2018). European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 29, 1016.

Kontakt

Technische Hinweise und weitere nützliche Informationen finden Sie in unserem TechniksUPPORT-Zentrum unter www.qiagen.com/Support. Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 00800-22-44-6000. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service oder Ihr lokaler Händler gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Kennzeichnung für europäische Konformität
	Kit enthält Reagenzien für <N> Reaktionen
	Verfallsdatum
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer
	Komponenten
	Enthält
	Anzahl
	Vor Lichteinwirkung schützen
	Global Trade Item Number (GTIN)
Rn	R = Revision der Gebrauchsanleitung (Handbuch); n = Revisionsnummer
	Zulässiger Temperaturbereich

Symbol

Bedeutung des Symbols



Hersteller



Gebrauchsanweisung beachten



Vorsicht

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Katalog-Nr.
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (24)	Für 24 Reaktionen: 6 Reaktionsgemische, Positivkontrolle, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase, Wasser als NTC und Wasser zur Probenverdünnung	873111
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: QIAamp MinElute® Säulen, Proteinase K, Puffer und Entnahmeröhrchen (2 ml)	60404
QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit		
QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: QIAamp MinElute Säulen, Proteinase K, Puffer und Entnahmeröhrchen (2 ml)	61504
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM und Zubehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR Thermocycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR Thermocycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002033

PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 dünnwandige Röhrrchen für 1000 Reaktionen mit 20–50 µl	981005
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 Streifen mit je 4 Röhrrchen und Deckeln, für 10.000 Reaktionen	981106
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium-Block für manuelles Ansetzen der Reaktion mit einer Einkanal-Pipette in 72 x 0,1-ml-Röhrrchen	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes	Aluminium-Ladeblock für den manuellen Reaktions-Setup mit einer Einkanalpipette in 96 x 0,2-ml-Röhrrchen	9018905
72-Well Rotor	Für die Aufnahme von Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, mit Reaktionsvolumen von 10-50 µl; erfordern einen Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Zur Befestigung der Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, im 72-Well-Rotor	9018904
QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold	Für die ctDNA-Aufreinigung	19413
QIAvac Connecting System	Für die ctDNA-Aufreinigung	19419
Vacuum Pump	Für die ctDNA-Aufreinigung; oder gleichwertige Pumpe zur Erzeugung eines Vakuums von –800 bis –900 mbar	84010

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

Bearbeitungshistorie des Dokuments

Datum	Änderungen
R1, Juni 2019	Erstversion
R2, September 2019	Korrektur der Spalte Häufigkeit in Tabelle 15; Korrektur von typographischen Fehlern; Aktualisierung des Layouts

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennen Käufer oder Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

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

Hinweis an den Käufer: Durch den Kauf dieses Produkts erhält der Käufer das beschränkte, nicht übertragbare Recht, nur diese Menge des Produkts zur Durchführung des patentierten Peptid-Nukleinsäure-(PNA)-Verfahrens ausschließlich für die in der beiliegenden QIAGEN-Gebrauchsanweisung oder Packungsbeilage beschriebenen, mit dem gekauften Produkt durchzuführenden Aktivitäten im Bereich der Humandiagnostik zu verwenden. Mit dem Kauf dieses Produkts erklärt sich der Käufer einverstanden, von Folgendem abzusehen: (1) das Produkt in irgendeiner Form weiter zu verkaufen; (2) das Produkt für Anwendungen in der Forensik zu verwenden; oder (3) das Produkt für andere Zwecke als die in dieser eingeschränkten Warenzeichen-Nutzungsvereinbarung angegebenen zu verwenden. Weitere Informationen über den Erwerb von Rechten an Patenten der Applied Biosystems LLC erhalten Sie von der Lizenzabteilung von Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad CA 92008, USA; Tel. (760) 603-7200; E-Mail outlicensing@lifetech.com.

Aktualisierte Lizenzbedingungen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie unter www.qiagen.com.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, *therascreen*® (QIAGEN Gruppe); DNAzap™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.); PIQRAY® (Novartis AG). Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

1116336 Sep-19 HB-2635-001 © 2019 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

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