

November 2017

# Handleiding *therascreen*<sup>®</sup> PITX2 RGQ PCR-kit



Versie 1



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik  
Voor gebruik met Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM-instrument  
Voor gebruik met QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE-weefselkit  
Voor gebruik met EpiTect<sup>®</sup> Fast DNA Bisulfite-kit



873211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
DUITSLAND



R1 1107245NL



# Inhoudsopgave

Beoogd gebruik.....	5
Samenvatting en uitleg .....	5
Uitgangspunt van de procedure.....	6
Meegeleverde materialen .....	12
Inhoud van de kit.....	12
Benodigde maar niet meegeleverde materialen .....	12
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen .....	15
Veiligheidsinformatie .....	15
Algemene voorzorgsmaatregelen .....	16
Bewaren en hanteren van reagentia.....	18
Verzendcondities.....	18
Bewaarcondities.....	19
Stabiliteit.....	19
Bewaring en verwerking van monsters .....	20
Procedure .....	21
Zuivering en bereiding van genomisch DNA .....	21
Deparaffinisatie van FFPE-coupes met de Deparaffinization Solution van QIAGEN.....	22
Handmatige gDNA-zuivering met de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit .....	24
Kwantificering van DNA .....	28
Omzetting van gDNA met bisulfiet met gebruikmaking van de EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit .....	29

---

Protocol: qPCR met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument .....	36
Interpretatie van de resultaten .....	55
Gegevensanalyse .....	55
Weergave van resultaten.....	59
Waarschuwingsberichten .....	61
Problemen oplossen .....	67
Kwaliteitscontrole.....	71
Beperkingen.....	72
Prestatiekenmerken .....	74
Blancolimiet .....	74
Detectielimiet .....	75
DNA-invoer .....	76
Lineariteit.....	76
Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid .....	77
Stoffen met een storende werking .....	78
Kruiscontaminatie .....	79
Tijdsbestek tijdens gebruik.....	79
Validatie klinische cut-off .....	79
Referenties .....	81
Symbolen .....	83
Contactgegevens.....	84
Bestelinformatie .....	85

---

# Beoogd gebruik

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit is een methylatiespecifieke in-vitro-realtime-PCR-test die bedoeld is voor de bepaling van de verhouding van het percentage methylatie (percent methylation ratio, PMR) in de hypofysehomeobox 2 (pituitary homeobox 2, PITX2)-promotor 2. Voor de test wordt met bisulfit omgezet gDNA uit FFPE-weefsel gebruikt dat uit borstkankerpatiënten met verhoogd risico is verkregen. De PMR zal klinici helpen bij de voorspelling van de respons op adjuvante, op anthracycline gebaseerde chemotherapie met of zonder endocriene therapie bij lymfeknooppositieve, oestrogeenreceptorpositieve, HER2-negatieve borstkankerpatiënten met verhoogd risico.

Het product is bedoeld voor gebruik door bevoegde gebruikers, zoals analisten en artsen die zijn opgeleid in moleculair-biologische technieken en in-vitrodiagnostische procedures.

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit wordt gebruikt met het QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-platform.

## Samenvatting en uitleg

De QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit wordt gebruikt voor het zuiveren van DNA uit FFPE-weefsel. Hypofysehomeobox 2 (PITX2) is een transcriptiefactor die wordt geïnduceerd door de Wnt/ $\beta$ -cateninesignaleringsroute. PITX2 werkt als een effector van Wnt-signalering door  $\beta$ -catenine aan te trekken en er een interactie mee aan te gaan, waardoor de expressie van doelgenen wordt verhoogd die betrokken zijn bij celproliferatie, -migratie, tumorprogressie en gevoeligheid voor chemische middelen (1–6). De genexpressieactiviteit van PITX2 wordt gereguleerd door methylatie binnen het promotorgebied ervan, de zogenaamde “epigenetische modificatie”. Kleine moleculen, de zogenaamde “methylgroepen”, zijn in het promotorgebied van een gen aan de DNA-base cytosine vastgehecht. Zo'n volledig of gedeeltelijk gemethyleerd gen wordt in zijn activiteit naar omlaag gereguleerd. Gemeld is dat

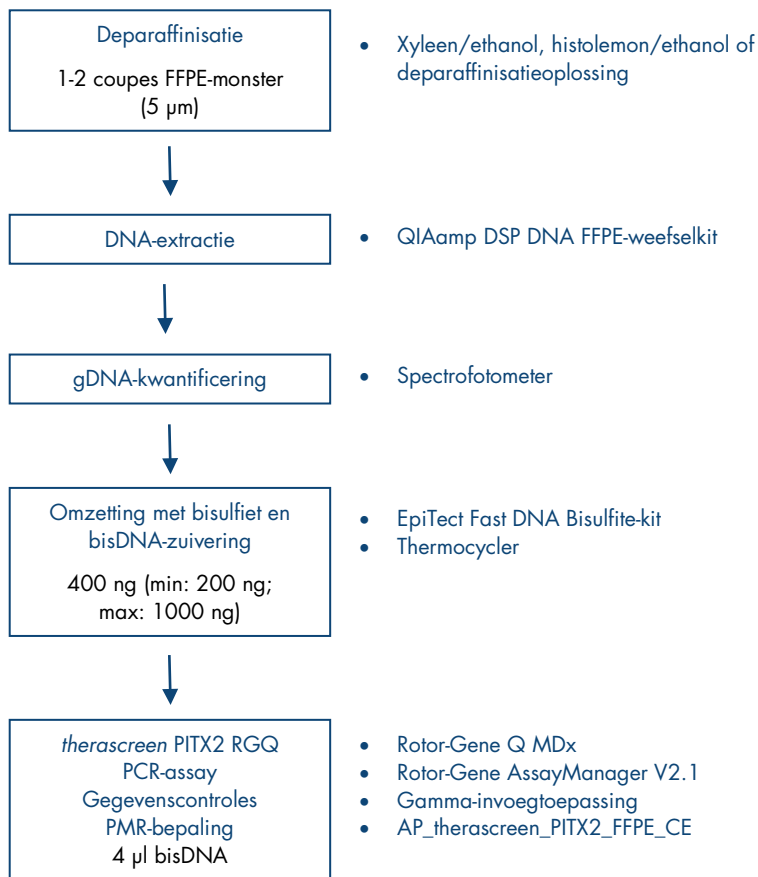
bij borstkanker PITX2 zowel een prognostische marker als een voorspellende marker voor de respons op endocriene of op anthracycline gebaseerde chemotherapie is. Verschillende klinische onderzoeken hebben een sterke statistische correlatie aangetoond tussen methylatie in het promotorgebied van het PITX2-gen en klinische uitkomstmaten, zoals progressievrije overleving, metastasevrije overleving, ziektevrije overleving en totale overleving (7–12).

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit is een methylatiespecifieke, op PCR gebaseerde (qMSP) realtime-assay. Het monstertype is bisDNA, d.w.z. met bisulfit omgezet genomisch DNA (gDNA). gDNA wordt eerst gezuiverd uit met formaline gefixeerd en in paraffine ingebed (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) weefsel dat uit lymfeknooppositieve, oestrogenreceptorpositieve, HER2-negatieve borstkankerpatiënten met verhoogd risico is verkregen. Na blootstelling aan bisulfit om onderscheid te maken tussen gemethyleerd en niet-gemethyleerd PITX2 wordt de verhouding van het percentage methylatie (PMR) van drie CpG-motieven van de PITX2-genpromotor 2 gekwantificeerd met behulp van qMSP en berekend met de Rotor-Gene AssayManager®-software met de Gamma-invoegtoepassing en het PITX2-assayprofiel. De verkregen PMR zal voor de behandelend arts informatie opleveren over de waarschijnlijkheid dat een patiënt zal reageren op chemotherapie die gebaseerd is op anthracycline. Als de verkregen PMR gelijk aan of lager dan 12 is, zal de patiënt waarschijnlijk reageren op chemotherapie die gebaseerd is op anthracycline. Als de verkregen PMR daarentegen hoger dan 12 is, kan er een alternatieve behandeling worden voorgesteld omdat de patiënt een kleinere kans heeft om te reageren op chemotherapie die gebaseerd is op anthracycline (zie “Validatie klinische cut-off” op pagina 79).

## Uitgangspunt van de procedure

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit gebruikt realtime-PCR (qPCR) voor de bepaling van de verhouding van het percentage methylatie (percent methylation ratio, PMR) in de PITX2-promotor 2. Het monstertype voor de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit is met bisulfit omgezet gDNA. Deze omzetting met bisulfit wordt uitgevoerd met gebruikmaking van de EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit (QIAGEN, cat.nr. 59824 of 59826). Het gDNA dat voor

deze omzetting wordt gebruikt, wordt met gebruikmaking van de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit (cat.nr. 60404) gezuiverd uit FFPE-weefsel van borstkankerpatiënten met verhoogd risico. De werkstroom wordt in afbeelding 1 weergegeven.



Afbeelding 1. Werkstroom *theascreen* PITX2 RGQ PCR-kit.

Het gebruik van qPCR maakt de nauwkeurige detectie van een getargetete bisDNA-sequentie tijdens de exponentiële fase van het amplificatieproces mogelijk. qPCR-gegevens kunnen snel

---

worden verkregen, zonder verwerking na de PCR, dankzij realtime-detectie van fluorescerende signalen tijdens de PCR-cyclus.

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit assay maakt gebruik van het principe van qPCR-oligonucleotidehydrolyse van de TaqMan®-probes in combinatie met methylatie-niet-specifieke primers (Afbeelding 2 op de volgende pagina). Bij deze assay wordt één paar primers gebruikt die alle met bisulfiet omgezette doelsequenties amplificeren. Er worden op basis van deze amplificatie twee verschillende signalen verkregen door twee TaqMan-probes te gebruiken die met verschillende kleurstoffen zijn gemerkt. Deze probes, die bestaan uit oligonucleotiden die zijn gemerkt met een 5'-reporterkleurstof (FAM™ of HEX™) en een downstream 3'-kleurstofvrije quencher, hybridiseren met de getargetete sequenties in het PCR-product. Eén probe is specifiek voor de bisDNA-sequenties afkomstig van gemethyleerde sequenties, gekleurd met FAM. De andere is specifiek voor de bisDNA-sequenties afkomstig van niet-gemethyleerde sequenties, gekleurd met HEX. Voor de analyse met behulp van TaqMan qPCR wordt gebruik gemaakt van de 5' → 3'-exonucleaseactiviteit van het *Thermus aquaticus* (*Taq*)-DNA-polymerase. Als de probe intact is, resulteert de nabijheid van de reporterkleurstof ten opzichte van de quencher in suppressie van de reporterfluorescentie, voornamelijk door Förster-energieoverdracht. Als het onderzochte doel aanwezig is, zullen gedurende de PCR de forward en reverse primers specifiek hybridiseren met de gehybridiseerde probe en deze flankeren. Het 3'-uiteinde van de probe wordt geblokkeerd om extensie van de probe tijdens de PCR te voorkomen (Afbeelding 3 op pagina 11). Tijdens de polymerisatiefase wordt de probe gekleefd door 5' → 3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase, wat leidt tot de vrijgave van de quencher en emissie van het reporterfluorescentiesignaal. De probefragmenten worden vervolgens van het doel af verplaatst en de polymerisatie van de streng gaat verder. Dit proces vindt plaats in elke cyclus en verstoort de exponentiële accumulatie van het product niet (Afbeelding 3 op pagina 11). De toename van het fluorescentiesignaal wordt alleen gedetecteerd als de doelsequentie complementair is met de primers en probe, en zodoende wordt geamplificeerd gedurende de PCR. De PCR-cyclus waarbij de fluorescentie van een reactie een vastgestelde drempelwaarde



---

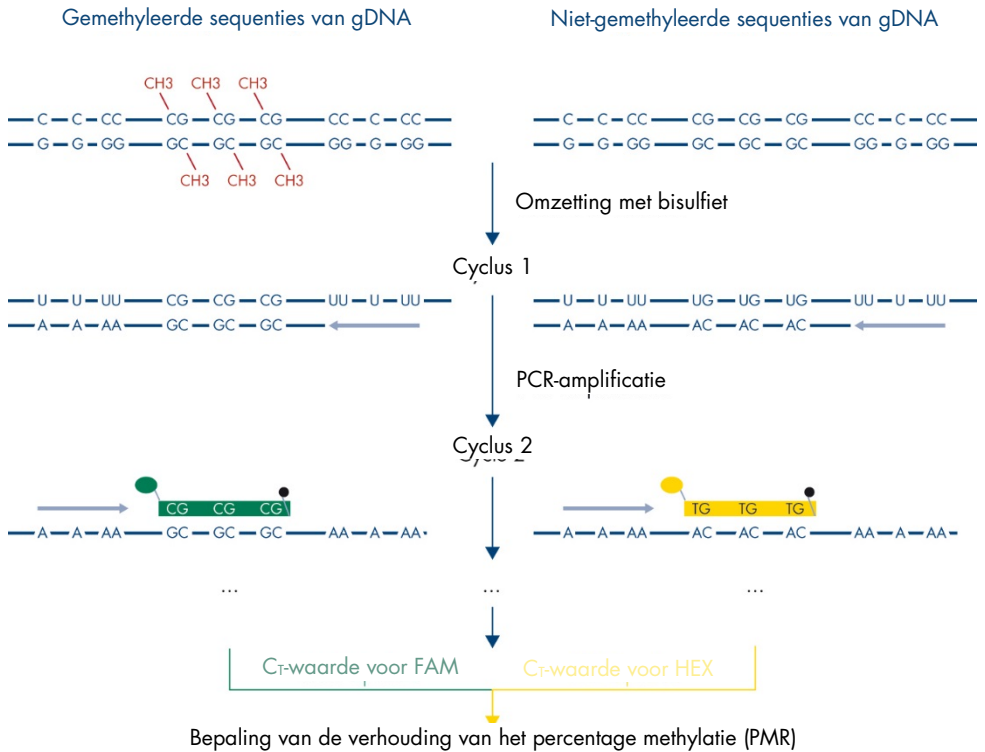
overschrijdt (gegeven door het *therascreen* PITX2-assaypakket), wordt gedefinieerd als de  $C_T$ -waarde.

De uitkomsten van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kitassay zijn twee  $C_T$ -waarden, één voor FAM en één voor HEX. Op basis van de  $\Delta C_T$ -waarde tussen beide signalen wordt er een PMR berekend (Afbeelding 2 op de volgende pagina). De PMR-berekening is gebaseerd op de volgende formule (11):

$$PMR = \frac{100}{1 + 2^{C_{T,FAM} - C_{T,HEX}}}$$

De verkregen PMR zal voor de behandelend arts informatie opleveren over de waarschijnlijkheid dat een patiënt zal reageren op chemotherapie die gebaseerd is op anthracycline. Als de verkregen PMR gelijk aan of lager dan 12 is, zal de patiënt waarschijnlijk reageren op chemotherapie die gebaseerd is op anthracycline. Als de verkregen PMR daarentegen hoger dan 12 is, kan er een alternatieve behandeling worden voorgesteld omdat de patiënt een kleinere kans heeft om te reageren op chemotherapie die gebaseerd is op anthracycline.

De doorlooptijd van alle taken, van gDNA-zuivering tot gegevensanalyse, is minder dan twee werkdagen.



**Afbeelding 2.** Principe van de *theascreen* PITX2 RGQ PCR-kitassay.

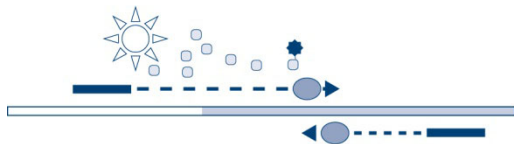


Hybridisatie

Primers en probe hybridiseren

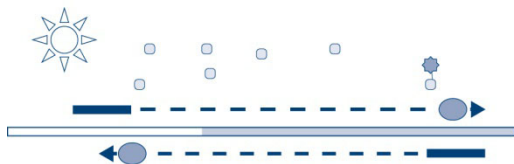


Polymerisatie  
Strengverplaatsing



Klieving

Leidt tot de vrijgave van quencherkleurstof  
en emissie van het  
reporterfluorescentiesignaal



Polymerisatie voltooid

Het PCR-product is voltooid en het  
fluorescentiesignaal accumuleert in  
elke cyclus



Afbeelding 3. Principe van de TaqMan realtime-PCR-assay.

# Meegeleverde materialen

## Inhoud van de kit

<b><i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit</b>		<b>(8)</b>
<b>Catalogusnr.</b>		<b>873211</b>
<b>Aantal reacties</b>		<b>8</b>
Paars	PITX2 RGQ PCR Master Mix (PCR-mastermengsel)	660 µl
Blauw	PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix (PCR-primer-probe-mengsel)	192 µl
Geel	PITX2 RGQ PCR Reference 50 (PCR-referentie 50)	12 µl
Oranje	PITX2 RGQ PCR Reference Low (PCR-referentie laag)	12 µl
Groen	PITX2 RGQ PCR Negative Control (PCR-negatieve controle)	12 µl
Kleurloos	PITX2 RGQ PCR NTC	12 µl
–	Instructions For Use (Handbook) Gebruiksaanwijzing (Handleiding)	1

## Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB) (safety data sheets, SDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Zorg ervoor dat instrumenten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant. Zorg ervoor dat voor alle kits de vervaldatum van de reagentia niet is verstreken en dat deze zijn vervoerd en bewaard onder de juiste condities.

## Reagentia

- Ethanol (moleculaire kwaliteitsgraad 96–100%)

**NB:** Gebruik geen gedestilleerde alcohol, aangezien deze andere substanties bevat, zoals methanol of methylethylketon.

## Apparatuur

- Thermomixer, schudapparaat met verwarming, verwarmingsblok of waterbad met mogelijkheden voor incubatie bij 56 °C en 90 °C.

**NB:** Let op de vereisten van de thermomixer ten aanzien van de buisvorm en selecteer de juiste buisgrootte (bijv. buizen van 2 of 1,5 ml)

- Verstelbare pipetten\* bestemd voor PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)  
Er wordt een minimum van twee pipetsets aanbevolen: één voor de bereiding en verdeling van PCR-reactiemengsels en één voor de verwerking van bisDNA en controles, waaronder het laden van de PCR-template.
- Nucleasevrije, aerosolresistente, steriele PCR-pipettips met hydrofobe filters (pipettips met aerosolbarrières worden aanbevolen ter voorkoming van kruiscontaminatie).
- 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (microcentrifugebuizen van 1,5 ml of 2 ml) (buizen van 1,5 ml zijn verkrijgbaar bij Eppendorf, cat.nr. 0030120.086 of Sarstedt, cat.nr. 72.690)
- Tafelcentrifuge met rotor voor reageerbuizen van 0,5 ml, 1,5 ml en 2,0 ml (kan 20.000 x g bereiken)
- Vortex
- Spectrofotometer, bijv. NanoDrop®-apparaat of QIAxpert® (QIAamp-invoegtoepassing: meting totaal nucleïnezuur)†
- Wegwerphandschoenen

\* Zorg ervoor dat apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† Dit is geen volledige lijst van leveranciers.

## Optionele reagentia voor controle van de werkstroom

- One vial containing one section (15 or 20  $\mu\text{m}$ ) of KRAS G13D Reference Standard (Eén flacon met één coupe (15 of 20  $\mu\text{m}$ ) KRAS G13D Reference Standard) (Horizon Discovery, cat.nr. HD216).

## Voor handmatige DNA-zuivering

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit) (cat.nr. 60404)
- Deparaffinization Solution (deparaffinisatieoplossing, cat.nr. 19093) of xyleen of histolemon (Carlo Erba, cat.nr. 454911)

**Belangrijk:** Deparaffinization Solution, xyleen of histolemon worden niet meegeleverd met de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit en moeten apart worden besteld.

## Aanvullend voor omzetting met bisulfit

- EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit) (cat.nr. 59824 of 59826)
- Reageerbuisjes van 0,2 ml of strips met 8 putjes
- Microcentrifuge voor buisjes van 0,2 ml
- Thermocycler met verwarmd deksel (aangezien de bisulfitreactie niet wordt bedekt met minerale olie zijn alleen thermocyclers met een verwarmd deksel geschikt voor deze procedure)

## Voor PCR op Rotor-Gene Q MDx

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (cat.nr. 9002032) en bijbehorende accessoires
- Rotor-Gene AssayManager-software versie 2.1.x (waarbij x = 0 of hoger)
- Gamma-invoegtoepassing versie 1.0.x (waarbij x = 0 of hoger) voor Rotor-Gene AssayManager v2.1
- theascreen\_PITX2\_FFPE\_CE-assayprofiel V1.0.x (waarbij x = 1 of hoger)
- Loading Block for 72 x 0.1 ml Tubes (laadblok voor 72 buisjes van 0,1 ml, cat.nr. 9018901)

- 72-Well Rotor (rotor met 72 putjes, cat.nr. 9018903)
- Adaptor Locking Ring 72-Well Rotor (vergrendelingsring voor rotor met 72 putjes, cat.nr. 9018904)
- Rotor Holder (rotorhouder, cat.nr. 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for the Rotor-Gene Q MDx (stripbuisjes met dopjes, 0,1 ml, voor de Rotor-Gene Q MDx, cat.nr. 981103 of 981106)
- IJs (of een koelblok)

## Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

### Veiligheidsinformatie

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB of SDS). Deze zijn als handige, compacte PDF-bestanden beschikbaar op [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Hier kunt u ook de VIB voor elke QIAGEN®-kit en elk onderdeel van de kit vinden, bekijken en afdrukken.

Voor veiligheidsinformatie met betrekking tot de Deparaffinization Solution, xyleen-ethanol, histolemon-ethanol, de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit of EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit kunt u de desbetreffende handleidingen raadplegen. Raadpleeg de desbetreffende gebruikershandleidingen voor veiligheidsinformatie met betrekking tot de instrumenten.

---

## Algemene voorzorgsmaatregelen

Voor het gebruik van qPCR-tests zijn goede laboratoriumtechnieken vereist, waaronder traceerbaarheid, onderhoud van de apparatuur voor moleculaire biologie en naleving van de geldende regelgeving en relevante normen.

Deze kit is bestemd voor in-vitrodiagnostisch gebruik. De reagentia en instructies in deze kit zijn getest voor optimale prestaties.

- Alle chemische en biologische materialen zijn potentieel gevaarlijk. Monsters zijn potentieel besmettelijk en dienen als biologisch gevaarlijk materiaal te worden behandeld.
- Gooi afval van monsters en assays weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.
- De reagentia voor de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit zijn optimaal verdund. Verdun reagentia niet nog meer, want dit kan leiden tot slechtere prestaties.
- Gebruik geen reactievolumes (reactiemengsel plus monster) van minder of meer dan 20 µl.
- De procedures voor kwaliteitscontrole van QIAGEN omvatten functionele tests van kits voor iedere afzonderlijke kitpartij. Meng daarom geen reagentia van verschillende partijen, aangezien dit invloed kan hebben op de werking.
- Voor de gehele werkstroom van *therascreen* PITX2 is het nodig dat monsters in verschillende buizen worden overgebracht. Zorg er daarom voor dat bij iedere stap de traceerbaarheid van de monsters goed in stand wordt gehouden.
- Zorg ervoor dat het PITX2-assayprofiel en de vereiste Gamma-invoegtoepassing van Rotor-Gene AssayManager v2.1 zijn geïnstalleerd.
- Raadpleeg de Rotor-Gene Q MDx User Manual (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene Q MDx) en de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager v2.1-basistoepassing) voor aanvullende waarschuwingen, voorzorgsmaatregelen en procedures.



- Het hanteren van andere incubatietijden of temperaturen kan leiden tot foutieve of strijdige gegevens.
- Ontdooi alle *therascreen* PITX2 RGQ PCR-onderdelen en monsters zo lang als nodig is in een koelkast, op ijs, in een koelblok of bij kamertemperatuur.

**NB:** Controleer in geval van ontdooiing bij kamertemperatuur regelmatig of het materiaal ontdooid is. Dit geldt in het bijzonder voor de PITX2 RGQ PCR Master Mix (MMx), omdat dit dNTP's bevat die temperatuurgevoelig zijn.

**NB:** PITX2 RGQ PCR PPM dient te worden beschermd tegen licht, omdat het gekleurde nucleotiden bevat.

**NB:** Herhaald ontdooien en invriezen dient te worden vermeden, en mag niet meer dan vier cycli van invriezen en ontdooien omvatten.

- Bereid alle reacties (reactiemengsel plus monster) op ijs of in een koelblok.
- Gebruik geen onderdelen waarvan de vervaldatum is verstreken of die onjuist zijn bewaard.
- Reactiemengsels kunnen veranderen als ze worden blootgesteld aan licht.
- Slik de reagentia niet in.
- Gebruik afzonderlijke, speciale pipetten om het reactiemengsel te maken en templates toe te voegen.
- Open het Rotor-Gene Q MDx-instrument niet totdat de run is voltooid.
- Open Rotor-Gene Q MDx-buisjes niet nadat de run is voltooid. Gooi buisjes weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.
- Wees extra voorzichtig om voor het correct testen van de monsters te zorgen en let op verkeerde invoer van monsters, fouten bij het laden en fouten met de pipetten.
- Zorg ervoor dat er op een systematische manier wordt omgegaan met de monsters, om voor een correcte identificatie te zorgen.
- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie van het reactiemengsel met de materialen in de PITX2 RGQ PCR Reference 50- en PITX2 RGQ PCR Reference Low Control-reagentia.

- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven DNA of PCR-product, die kan leiden tot een fout-positief signaal.
- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie door DNase, die kan leiden tot afbraak van het template-DNA.

We raden het volgende aan:

- Gebruik nucleasevrije laboratoriumbenodigdheden (zoals pipetten, pipettips, reactieflacons) en draag wegwerphandschoenen wanneer u de assay uitvoert.
- Gebruik bij alle stappen van het pipetteren ongebruikte aerosolresistente pipettips ter voorkoming van kruiscontaminatie van de monsters en reagentia.

Bereid een PCR-reactiemengsel met speciaal daarvoor bestemde materialen (pipetten, tips, etc.) in een speciaal daarvoor bestemde ruimte waar geen DNA-matrijzen (DNA, plasmiden of PCR-producten) kunnen worden geïntroduceerd. Voeg in deze ruimte PITX2 RGQ PCR NTC aan de desbetreffende buis toe (afbeelding 4 op pagina 39), maar sluit deze buis nadat alle andere controles en monsters zijn geladen om kruiscontaminatie vast te kunnen stellen. De monsters die u wilt testen, PITX2 RGQ PCR Reference 50, PITX2 RGQ PCR Reference Low en PITX2 RGQ PCR Negative Control, voegt u in een andere ruimte toe met specifiek materiaal (pipetten, tips, etc.).

## Bewaren en hanteren van reagentia

### Verzendcondities

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit wordt verzonden op droogijs. Als een onderdeel van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit bij aankomst niet bevroren is, als de buitenverpakking tijdens het vervoer open is geraakt of als de verzending geen pakbon of reagentia bevat, neemt u contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN of met de lokale distributeur (ga naar [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

---

## Bewaarcondities

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit moet direct na ontvangst worden bewaard bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C. Gebruik daarvoor een vriezer met een constante temperatuur die is beschermd tegen licht.

Voor informatie met betrekking tot het bewaren en hanteren van de Deparaffinization Solution, xyleen-ethanol, histolemon-ethanol, de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit of EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit kunt u de desbetreffende handleidingen raadplegen.

## Stabiliteit

Als de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit wordt bewaard onder de gespecificeerde bewaarcondities, is de kit stabiel tot de vermelde vervaldatum.

Eenmaal geopend kunnen reagentia in de originele verpakking worden bewaard bij een temperatuur van -30 tot -15 °C tot de vervaldatum die staat vermeld op de verpakking. Herhaald ontdooien en invriezen dient te worden vermeden, en mag niet meer dan vier cycli van invriezen en ontdooien omvatten.

Voor informatie met betrekking tot de stabiliteit van de Deparaffinization Solution, xyleen-ethanol, histolemon-ethanol, de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit of EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit kunt u de desbetreffende handleidingen raadplegen.

Let goed op de vervaldatum en bewaarcondities die staan vermeld op het etiket van de doos en op de etiketten van de onderdelen. Gebruik geen onderdelen waarvan de vervaldatum is verstreken of die onjuist zijn bewaard.

# Bewaring en verwerking van monsters

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit is bedoeld voor gebruik met bisDNA-monsters. Het gezuiverde en met bisulfiet omgezette DNA is afkomstig van FFPE-tumorweefsel dat uit primaire laesies van lymfeknooppositieve, oestrogenreceptorpositieve, HER2-negatieve borstkankerpatiënten met verhoogd risico is genomen. Fixeer de weefselmonsters in formaline volgens het protocol van uw laboratorium (over het algemeen geldt 10% neutraal gebufferde formaline als aanvaardbaar), zo snel mogelijk na chirurgische verwijdering.

- Het weefselmonster dient zo snel mogelijk na chirurgische verwijdering of kernbiopsie in 4–10% formaline te worden gefixeerd.
- Gebruik idealiter een fixatieduur van 14–24 uur (een langere fixatieduur leidt tot ernstigere fragmentatie van het DNA, wat een nadelige invloed kan hebben op de resultaten van qPCR/qMSP-assays).
- Zorg ervoor dat de monsters grondig gedehydrateerd zijn voordat ze worden ingebed (resten formaline kunnen de digestie door proteïnase K remmen).
- Er moeten van het paraffineblok coupes van 5 µm dik worden gesneden.
- Voor coupes met een tumoroppervlakte < 100 mm<sup>2</sup> wordt aanbevolen om twee coupes te verwerken om de totale tumoroppervlakte te vergroten tot minimaal 100 mm<sup>2</sup>.
- Etiketteer, hanteer en bewaar tumormonsters, blokken, coupes en monsters die klaar zijn voor zuivering op een gecontroleerde wijze conform lokale procedures.
- Vervoer en bewaar FFPE-blokken en coupes bij kamertemperatuur. De coupes kunnen snel worden gebruikt voor DNA-zuivering.
- DNA dat is gezuiverd met gebruikmaking van de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit kan bij 2–8 °C worden bewaard voor bewaring tot 24 uur of bij –30 tot –15 °C als langdurige bewaring nodig is.

- Met bisulfiet omgezet DNA, waarbij de EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit werd gebruikt, kan ten minste 9 maanden bij  $-30$  tot  $-15$  °C worden bewaard zonder kwaliteitsvermindering of een verminderde omzetting. Verder onderzoek naar bewaring op lange termijn loopt nog. Neem voor meer informatie contact op met QIAGEN.
- De werkstroomcontrole KRAS G13D Reference Standard-coupe (Horizon Discovery, cat.nr. HD216) kan gedurende 36 maanden vanaf de datum van vervaardiging bij kamertemperatuur worden bewaard.

## Procedure

### Zuivering en bereiding van genomisch DNA

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit is gevalideerd in combinatie met QIAGEN Deparaffinization Solution (cat.nr. 19093) voor deparaffinisatie van FFPE-coupees, de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit (cat.nr. 60404) voor gDNA-zuivering en de EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit (cat.nr. 59824 of 59826) voor omzetting van gDNA met bisulfiet.

De deparaffinisatie van FFPE-coupees kan worden uitgevoerd met gebruikmaking van Deparaffinization Solution, xyleen-ethanol of histolemon-ethanol (de gelijkwaardigheid van deze drie deparaffinisatiemethoden werd bewezen tijdens de ontwikkeling van het product).

Als de Deparaffinization Solution (cat.nr. 19093) wordt gebruikt, begint u met de procedure "Deparaffinisatie van FFPE-coupees met de Deparaffinization Solution van QIAGEN" op pagina 22.

Als xyleen-ethanol of histolemon-ethanol wordt gebruikt, gaat u rechtstreeks naar de procedure "Handmatige gDNA-zuivering met de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit" op pagina 24.

**Optioneel:** Om te bepalen of de zuivering en omzetting met bisulfiet op de juiste manier worden uitgevoerd, kan een werkstroomcontrole worden gebruikt. De werkstroomcontrole die

---

is gevalideerd voor de werkstroom van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit is de KRAS G13D Reference Standard-coupe (Horizon Discovery, cat.nr. HD216).

Zorg ervoor dat de vervaldatum van de reagentia voor gDNA-zuivering niet is verstreken en dat deze zijn vervoerd en bewaard onder de juiste condities. Gebruik geen onderdelen waarvan de vervaldatum is verstreken of die onjuist zijn bewaard.

## Uitgangsmateriaal

Uitgangsmateriaal voor de zuivering van DNA dient te bestaan uit vers gesneden coupes van FFPE-weefsel. Deze kunnen zo nodig overnacht bij kamertemperatuur worden gehouden. Maximaal twee coupes, elk met een dikte van 5 µm en een totale oppervlakte van meer dan 100 mm<sup>2</sup>, moeten worden gebruikt als uitgangsmateriaal voor de gDNA-zuivering.

## Deparaffinisatie van FFPE-coupes met de Deparaffinization Solution van QIAGEN

**BELANGRIJK:** Als de deparaffinisatie wordt uitgevoerd met xyleen-ethanol of histolemon-ethanol, ga dan naar "Handmatige gDNA-zuivering met de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit" op pagina 24.

### Wat u moet weten voor u begint

- Voer alle centrifugatiestappen uit bij kamertemperatuur (15–25 °C).
- Equilibreer alle buffers op kamertemperatuur; equilibreer de Deparaffinization Solution op 20–25 °C.
- Deparaffinization Solution wordt niet meegeleverd met de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit en moet apart worden besteld.

## Wat u moet doen voor u begint

- Verwarm een thermomixer of schudapparaat met verwarming vóór op 56 °C voor gebruik in stap 4 en 8. Als er geen thermomixer of schudapparaat met verwarming beschikbaar is, kan in plaats daarvan een verwarmingsblok of waterbad worden gebruikt.
- Los eventueel precipitaat in buffer AL of buffer ATL op door de buffers onder voorzichtig schudden te verwarmen op 70 °C.
- Zorg dat buffer AW1 en buffer AW2 zijn bereid volgens de instructies in het *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook* (Handleiding QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit).

## Procedure (voor maximaal twee coupes)

1. Snijd met een scalpel een eventuele overmaat aan paraffine van het monsterblok af. Snijd het blok in coupes van 5 µm dik.  
**NB:** Als het oppervlak van het monster was blootgesteld aan de lucht, gooi de eerste 2–3 coupes dan weg.
2. Plaats de coupe(s) onmiddellijk in een microcentrifugebuis van 1,5 ml of 2 ml (niet meegeleverd).
3. Voeg 160 µl Deparaffinization Solution toe en vortex krachtig gedurende 10 seconden. Centrifugeer het buisje kort zodat al het monster zich onder in het buisje bevindt.
4. Incubeer gedurende 3 minuten bij 56 °C en laat vervolgens het buisje op kamertemperatuur (15–25 °C) afkoelen.
5. Voeg 180 µl buffer ATL toe en vortex om te mengen.
6. Centrifugeer 1 minuut bij 11.000 x g (10.000 omw/min). Er verschijnen twee fasen (blauw en doorzichtig).
7. Voeg 20 µl proteïnase K aan de onderste, doorzichtige fase toe door de pipet door de bovenste fase heen te duwen. Meng voorzichtig door op-en-neer te pipetteren.
8. Incubeer gedurende  $\geq 1$  uur bij 56 °C  $\pm$  3 °C (of tot het monster volledig gelyseerd is).

9. Incubeer gedurende 1 uur  $\pm$  5 minuten bij  $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Door de incubatie bij  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  in buffer ATL wordt de modificatie van nucleïnezuren door formaldehyde gedeeltelijk ongedaan gemaakt. Langere incubatietijden of hogere incubatietemperaturen kunnen leiden tot gefragmenteerder DNA.

**NB:** Als er slechts één verwarmingsblok wordt gebruikt, zet het monster dan bij kamertemperatuur ( $15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) na de incubatie bij  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  in stap 8, tot het verwarmingsblok op  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  is gekomen voor stap 9.

10. Centrifugeer het buisje van 1,5 ml kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen.

11. Breng de onderste, doorzichtige fase over naar een nieuwe microcentrifugebuis van 2 ml (niet meegeleverd).

**NB:** Zorg ervoor dat u geen blauwe fase overbrengt.

12. Ga verder met stap 14 van "Handmatige gDNA-zuivering met de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit" op pagina 24.

## Handmatige gDNA-zuivering met de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit

Handmatige gDNA-zuivering dient te worden uitgevoerd met de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit (cat.nr. 60404) conform het *Handleiding QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit*.

Wat u moet weten voor u begint

- Voer alle centrifugatiestappen uit bij kamertemperatuur ( $15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Wat u moet doen voor u begint

- Equilibreer alle buffers op kamertemperatuur.
- Stel een thermomixer of schudapparaat met verwarming in op  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  voor gebruik in stap 12.



- Als er geen thermomixer of schudapparaat met verwarming beschikbaar is, kan in plaats daarvan een verwarmingsblok of waterbad worden gebruikt.
- Los eventueel precipitaat in buffer AL of buffer ATL op door de buffer onder voorzichtig schudden te verwarmen op 70 °C.
- Zorg dat buffer AW1 en buffer AW2 zijn bereid volgens de instructies in het *Handleiding QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit*.

## Procedure

**NB:** Als de Deparaffinization Solution van QIAGEN wordt gebruikt, dienen stap 1 tot 14 te worden vervangen door de procedure die wordt beschreven in “Deparaffinisatie van FFPE-coupes met de Deparaffinization Solution van QIAGEN” op pagina 22.

1. Snijd met een scalpel een eventuele overmaat aan paraffine van het monsterblok af.
2. Snijd 1 tot 2 coupes van 5 µm dik om tot een tumoroppervlakte van minstens 100 mm<sup>2</sup> te komen (zie “Uitgangsmateriaal” op pagina 22).

Als het oppervlak van het monster was blootgesteld aan de lucht, gooi de eerste 2–3 coupes dan weg.

3. Plaats de coupes onmiddellijk in een microcentrifugebuis van 1,5 of 2 ml (niet meegeleverd).
4. Voeg 1 ml xyleen of histolemon aan het monster toe. Doe het dopje dicht en vortex krachtig gedurende  $\geq 10$  seconden.
5. Centrifugeer 2 minuten  $\pm$  30 seconden bij kamertemperatuur op maximale snelheid.
6. Pipetteer het supernatant af. Laat de gehele pellet zitten.
7. Voeg 1 ml ethanol (96–100%) aan de pellet toe en vortex om te mengen.  
Het ethanol zorgt voor de extractie van achtergebleven xyleen uit het monster.
8. Centrifugeer 2 minuten  $\pm$  30 seconden bij kamertemperatuur op maximale snelheid.
9. Pipetteer het supernatant af. Laat de gehele pellet zitten.

Verwijder met een dunne pipetpunt eventuele achtergebleven restjes ethanol.

10. Incubeer het geopende buisje bij 15–40 °C. Incubeer gedurende 10 minuten  $\pm$  1 minuut of tot alle overgebleven ethanol is verdampt.
11. Resuspendeer de pellet in 180  $\mu$ l buffer ATL. Voeg 20  $\mu$ l proteïnase K toe en vortex om te mengen.
12. Incubeer gedurende  $\geq$  1 uur bij 56 °C  $\pm$  3 °C (of tot het monster volledig gelyseerd is).
13. Incubeer gedurende 1 uur  $\pm$  5 minuten bij 90 °C  $\pm$  5 °C.

Door de incubatie bij 90 °C in buffer ATL wordt de modificatie van nucleïne-zuren door formaldehyde gedeeltelijk ongedaan gemaakt. Langere incubatietijden of hogere incubatietemperaturen kunnen leiden tot gefragmenteerder DNA. Als er slechts één verwarmingsblok wordt gebruikt, zet het monster dan bij kamertemperatuur na de incubatie bij 56 °C tot het verwarmingsblok op 90 °C is gekomen.

14. Centrifugeer het buisje kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen.

**NB:** Als de Deparaffinization Solution wordt gebruikt, ga dan verder met stap 15.

15. Voeg 200  $\mu$ l buffer AL aan het monster toe en vortex om goed te mengen. Voeg vervolgens 200  $\mu$ l ethanol (96–100%) toe en vortex nogmaals om goed te mengen. Het is essentieel dat het monster, Buffer AL en het ethanol onmiddellijk grondig worden gemengd door te vortexen of op-en-neer te pipetteren, om een homogene oplossing te verkrijgen. Buffer AL en het ethanol kunnen ook vooraf worden gemengd en samen in één stap worden toegevoegd om tijd te besparen bij de verwerking van meerdere monsters. Na toevoeging van buffer AL en ethanol kan een wit precipitaat worden gevormd. Dit precipitaat heeft geen nadelig effect op de QIAamp-procedure.

16. Centrifugeer het buisje kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen.
17. Breng het gehele lysaat voorzichtig over naar de QIAamp MinElute®-kolom (in een verzamelbuisje van 2 ml) zonder daarbij de rand te bevochtigen. Doe het dopje dicht en centrifugeer  $\geq$  1 minuut bij ongeveer 6000  $\times$  g. Plaats de QIAamp MinElute-kolom in een schoon verzamelbuisje van 2 ml (meegeleverd) en gooi het verzamelbuisje met de niet-gebonden vloeistof weg.

---

Als niet al het lysaat na centrifugeren door het membraan is gelopen, centrifugeer dan nogmaals bij een hogere snelheid tot de QIAamp MinElute-kolom leeg is.

18. Open de QIAamp MinElute-kolom voorzichtig en voeg 500  $\mu$ l buffer AW1 toe zonder de rand te bevochtigen. Doe het dopje dicht en centrifugeer gedurende  $\geq 1$  minuut bij ongeveer 6000  $\times g$ . Plaats de QIAamp MinElute-kolom in een schoon verzamelbuisje van 2 ml (meegeleverd) en gooi het verzamelbuisje met de niet-gebonden vloeistof weg.
19. Open de QIAamp MinElute-kolom voorzichtig en voeg 500  $\mu$ l buffer AW2 toe zonder de rand te bevochtigen. Doe het dopje dicht en centrifugeer gedurende  $\geq 1$  minuut bij ongeveer 6000  $\times g$ . Plaats de QIAamp MinElute-kolom in een schoon verzamelbuisje van 2 ml (meegeleverd) en gooi het verzamelbuisje met de niet-gebonden vloeistof weg.  
De niet-gebonden vloeistof mag niet in aanraking komen met de QIAamp MinElute-kolom. Bij sommige centrifuges kan tijdens het afremmen vibratie van de rotor optreden, waardoor de doorgelopen vloeistof, die ethanol bevat, in aanraking komt met de QIAamp MinElute-kolom. Ga zorgvuldig te werk als u de QIAamp MinElute-kolom en het verzamelbuisje uit de rotor haalt, zodat de doorgelopen vloeistof niet in aanraking komt met de QIAamp MinElute-kolom.
20. Centrifugeer gedurende  $\geq 3$  minuten op maximale snelheid (ongeveer 20.000  $\times g$ ) om het membraan volledig te drogen.  
Deze stap is noodzakelijk omdat ethanol dat in het eluaat is achtergebleven, de qPCR-reacties die worden uitgevoerd kan remmen.
21. Plaats de QIAamp MinElute-kolom in een schoon microcentrifugebuisje van 1,5 ml (meegeleverd) en gooi het verzamelbuisje met de niet-gebonden vloeistof weg. Open het dopje van de QIAamp MinElute-kolom voorzichtig en breng 50  $\mu$ l buffer ATE over naar het midden van het membraan.
22. Doe het dopje dicht en incubeer gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur (15–25  $^{\circ}$ C). Centrifugeer gedurende  $\geq 1$  minuut op maximale snelheid (ongeveer 20.000  $\times g$ ).

## Kwantificering van DNA

Buffer ATE die in gDNA-zuiveringskits wordt gebruikt voor elutie bevat het conserveringsmiddel natriumazide. Natriumazide absorbeert bij 260 nm. Daarom moet er een blanco meting met buffer ATE worden uitgevoerd om de spectrofotometer te kalibreren.

De DNA-concentratie wordt bepaald door de absorptie bij 260 nm te meten volgens de apparaatprocedure onder gebruik van bijvoorbeeld QIAxpert van QIAGEN (QIAamp-invoegtoepassing: meting van totaal nucleïnezuur) of een NanoDrop-instrument\*. Absorptiemetingen bij 260 nm zijn alleen nauwkeurig als ze tussen 0,1 en 1,0 vallen. Een absorptie van 1 eenheid bij 260 nm komt overeen met 50 µg DNA per ml ( $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$ ). De totale hoeveelheid gezuiverd DNA (ng) = DNA-concentratie (ng/µl) × volume van het monster (µl).

**NB:** Als de QIAamp-invoegtoepassing wordt gebruikt, wordt een intern ATE-blanco spectrum automatisch afgetrokken van de OD-waarden, zodat er geen bijkomend blanco ATE-monster nodig is met deze configuratie.

Idealiter bedraagt een minimale gDNA-concentratie 10 ng/µl<sup>†</sup>, maar er kunnen monsters van slechts 5 ng/µl worden verwerkt waarbij wel een risico bestaat op ongeldige resultaten als gevolg van “Low input” (lage invoer).

\* Dit is geen volledige lijst van mogelijke spectrofotometers voor meting van de OD<sub>260</sub> nm.

† 10 ng/µl om een gDNA-invoer van 400 ng (aanbevolen invoer) voor omzetting met bisulfiet te verkrijgen omdat het maximale volume gDNA voor omzetting 40 µl is.

---

## Omzetting van gDNA met bisulfit met gebruikmaking van de EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit

Met dit protocol is een omzetting met bisulfit mogelijk van DNA-hoeveelheden van 200, 400 of maximaal 1000 ng (gemeten door bepaling van de OD<sub>260</sub> nm) in een volume van maximaal 40 µl. De aanbevolen DNA-invoer per omzettingsreactie met bisulfit bedraagt 400 ng. In geval van een lage DNA-opbrengst kan echter een DNA-invoer van slechts 200 ng worden gebruikt, en in geval van hertesten als gevolg van het waarschuwingsbericht "Low input" tijdens de qPCR-analyse (zie "Waarschuwingsberichten" op pagina 61), dient 1000 ng of een hoeveelheid die daar zo dicht mogelijk bij in de buurt komt te worden gebruikt.

**NB:** De gDNA-invoer verwijst naar gDNA-kwantificering met meting van de OD<sub>260</sub> (bijv. met gebruikmaking van een NanoDrop of QIAxpert met QIAamp-invoegtoepassing voor meting van totaal nucleïnezuur).

### Uitgangsmateriaal

- Voor de behandeling met bisulfit dient genomisch DNA te worden gebruikt zonder voorafgaande stap van restrictiedigestie.

### Wat u moet weten voor u begint

- Zorg ervoor dat de vervaldatum van de reagentia voor omzetting met bisulfit niet is verstreken en dat deze zijn vervoerd en bewaard onder de juiste condities. Gebruik geen onderdelen waarvan de vervaldatum is verstreken of die onjuist zijn bewaard.
- DNA Protect Buffer dient van groen in blauw te veranderen na toevoeging aan het DNA-Bisulfite Solution-mengsel, wat aangeeft dat dit voldoende gemengd was en dat de pH juist is voor de omzettingsreactie met bisulfit. Een onjuiste pH kan invloed hebben op de fixatie van het omgezette DNA op de kolom.
- Voer alle centrifugatiestappen uit bij kamertemperatuur (15–25 °C).

- Bisulfite Solution kan minstens 6 maanden bij kamertemperatuur (15–25 °C) worden bewaard.
- Na enige bewaartijd kunnen zich witte precipitaten in het Buffer BD-ethanolmengsel vormen. Deze precipitaten hebben geen invloed op de werking van Buffer BD. Het overbrengen van precipitaten naar de MinElute DNA-spinkolom dient echter te worden vermeden.

### Wat u moet doen voor u begint

- Bereid de kitreagentia zoals beschreven in het onderdeel “Bereiding van reagentia” van het *EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbook* (Handleiding EpiTect Fast Bisulfite Conversion).
- Equilibreer monsters en buffers op kamertemperatuur.
- **Optioneel:** Stel een thermomixer, verwarmingsblok of schudapparaat met verwarming in op 60 °C om de Bisulfite Solution op te lossen.

### Hanteren van MinElute DNA-spinkolommen

Technieken waarbij gebruik wordt gemaakt van nucleïnezuuramplificatie zijn erg gevoelig; bij gebruik van de MinElute DNA-spinkolommen zijn daarom de volgende voorzorgsmaatregelen noodzakelijk om kruiscontaminatie tussen monsterbereidingen te voorkomen:

- Pipetteer het monster of de oplossing voorzichtig in de MinElute DNA-spinkolom zonder de rand van de kolom te bevochtigen. Raak het membraan van de MinElute DNA-spinkolom niet aan met de pipettip.
- Gebruik na het overbrengen van ieder volume vloeistof steeds een nieuwe pipettip. Wij raden aan gebruik te maken van pipettips met aerosolfilter.
- Open niet meer dan één MinElute DNA-spinkolom tegelijk en zorg dat er geen aerosolen kunnen worden gevormd.
- Draag tijdens de gehele procedure handschoenen. Als de handschoenen in aanraking komen met het monster dienen de handschoenen onmiddellijk te worden vervangen.

## Centrifugatie

- De MinElute DNA-spinkolommen passen in de meeste standaard microcentrifugebuisjes van 1,5–2 ml. Een stel verzamelbuisjes van 2 ml wordt meegeleverd voor de stap van droogcentrifugerem.
- Alle centrifugatiestappen moeten plaatsvinden bij kamertemperatuur (15–25 °C).
- Verwerk MinElute DNA-spinkolommen in een microcentrifuge.
- Doe altijd de dop op een MinElute DNA-spinkolom alvorens deze in de microcentrifuge te plaatsen.
- Om meerdere monsters tegelijkertijd efficiënt te kunnen verwerken, raden wij aan in een rek de benodigde verzamelbuisjes klaar te zetten zodat de MinElute DNA-spinkolommen na centrifugatie naar de buisjes kunnen worden overgebracht. Verzamelbuisjes kunnen verschillende keren worden gebruikt.

## Procedure

1. Ontdooi het DNA dat u wilt gebruiken in de omzettingsreacties met bisulfiet. Zorg ervoor dat de Bisulfite Solution volledig wordt opgelost.

**NB:** Verwarm zo nodig de Bisulfite Solution op 60 °C en vortex de oplossing tot alle precipitaten weer zijn opgelost.

**NB:** Plaats de opgeloste Bisulfite Solution niet op ijs.

2. Bereid de bisulfietreacties in PCR-buisjes van 200 µl (niet meegeleverd) volgens Tabel 1 op de volgende pagina. Voeg ieder bestanddeel in de aangegeven volgorde toe.

**NB:** Het gecombineerde volume van DNA en RNase-vrij water moet in totaal 40 µl zijn.

**NB:** Om het juiste volume voor de gDNA-invoer van belang te bepalen dient de volgende formule te worden gebruikt:

$$\text{gDNA-volume dat vereist is voor een omzetting met bisulfiet (}\mu\text{l)} = \frac{\text{Invoer van belang (ng)}}{\text{Gemiddelde gDNA-concentratie (ng/}\mu\text{l)}}$$

**NB:** Wanneer de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit wordt gebruikt, moet altijd het “Low concentration” (lage concentratie)-protocol uit het *EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbook* worden gebruikt, ook met een invoer van 1000 ng, omdat de concentratie van gDNA dat is gezuiverd uit FFPE-monsters gewoonlijk laag is.

**NB:** Het bisulfietmengsel moet onmiddellijk 5 seconden worden gevortext na toevoeging van de DNA Protect Buffer, om de monsters te beschermen tegen afbraak.

**Tabel 1. Bestanddelen van de bisulfietreactie**

Bestanddeel	Volume per reactie (µl)
DNA	Variabel* (maximaal 40 µl)
RNase-vrij water	Variabel*
Bisulfite Solution	85
DNA Protect Buffer	15
<b>Totaal volume</b>	<b>140</b>

\* Het gecombineerde volume van DNA en RNase-vrij water moet in totaal 40 µl zijn.

3. Sluit de PCR-buisjes af en zorg ervoor dat u de bisulfietreacties onmiddellijk grondig mengt. Bewaar de buisjes bij kamertemperatuur (15–25 °C).

**NB:** DNA Protect Buffer dient van groen in blauw te veranderen na toevoeging aan het DNA-Bisulfite Solution-mengsel, wat aangeeft dat dit voldoende gemengd was en dat de pH juist is voor de omzettingsreactie met bisulfiet, of dat het DNA aan de MinElute DNA-spinkolom bindt.

4. Voer de DNA-omzetting met bisulfiet uit met gebruikmaking van een thermocycler. Programmeer de thermocycler volgens Tabel 2 op de volgende pagina.

De volledige cyclus hoort ongeveer 30 minuten in beslag te nemen.

**NB:** Als u een thermocycler gebruikt waarop u niet het reactievolume (140 µl) kunt invoeren, stel het instrument dan in op het grootst mogelijke volume.



Tabel 2. Thermocyclercondities voor de omzetting met bisulfiet

Stap	Tijd	Temperatuur
Denaturatie	5 min	95 °C
Incubatie	10 min	60 °C
Denaturatie	5 min	95 °C
Incubatie	10 min	60 °C
Vasthouden	Voor onbepaalde tijd*	20 °C

\* Omgezet DNA kan overnacht in de thermocycler worden gelaten zonder verlies van prestaties.

5. Plaats de PCR-buisjes met de bisulfietreacties in de thermocycler. Start de incubatie in de thermocycler.

**BELANGRIJK:** Aangezien de bisulfietreactie niet wordt bedekt met minerale olie zijn alleen thermocyclers met een verwarmd deksel geschikt voor deze procedure. Het is belangrijk om PCR-buisjes te gebruiken die goed kunnen worden afgesloten.

**NB:** Omgezet DNA kan overnacht in de thermocycler worden gelaten zonder verlies van prestaties.

### Zuivering van met bisulfiet omgezet DNA

6. Zodra de omzetting met bisulfiet is voltooid dient u de PCR-buisjes met de bisulfietreacties kort te centrifugeren, en vervolgens de volledige bisulfietreacties over te brengen naar schone microcentrifugebuisjes van 1,5 ml.

Het overbrengen van precipitaten in de oplossing zal geen invloed hebben op de prestaties of opbrengst van de reactie.

7. Voeg aan ieder monster 310 µl Buffer BL toe. Meng de oplossing door te vortexen en centrifugeer vervolgens kort.

8. Voeg aan ieder monster 250 µl ethanol (96–100%) toe. Meng de oplossingen door 15 seconden gepulseerd te vortexen en centrifugeer kort om de druppeltjes van de onderkant van de dop te verwijderen.
9. Plaats het benodigde aantal MinElute DNA-spinkolommen en verzamelbuizen in een geschikt rek. Breng het gehele mengsel uit iedere buis van stap 8 over naar de corresponderende MinElute DNA-spinkolom.
10. Centrifugeer de spinkolommen 1 minuut op maximale snelheid. Gooi de niet-gebonden vloeistof weg en plaats de spinkolommen in de verzamelbuizen terug.
11. Voeg aan iedere spinkolom 500 µl Buffer BW (wasbuffer) toe en centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid. Gooi de niet-gebonden vloeistof weg en plaats de spinkolommen in de verzamelbuizen terug.
12. Voeg aan iedere spinkolom 500 µl Buffer BD (desulfoneringsbuffer) toe en incubeer 15 minuten bij kamertemperatuur (15–25 °C).

Als er zich precipitaten in Buffer BD bevinden, zorg er dan voor dat u ze niet overbrengt naar de spinkolommen.

**BELANGRIJK:** De fles met Buffer BD moet onmiddellijk na gebruik worden afgesloten om verzuring door koolstofdioxide in de lucht te voorkomen.

**NB:** Het is belangrijk om de dopjes van de spinkolommen vóór de incubatie af te sluiten.
13. Centrifugeer de spinkolommen 1 minuut op maximale snelheid. Gooi de niet-gebonden vloeistof weg en plaats de spinkolommen in de verzamelbuizen terug.
14. Voeg aan iedere spinkolom 500 µl Buffer BW toe en centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid. Gooi de niet-gebonden vloeistof weg en plaats de spinkolommen in de verzamelbuizen terug.
15. Herhaal stap 14 eenmaal.
16. Voeg aan iedere spinkolom 250 µl ethanol (96–100%) toe en centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid.

- 
17. Plaats de spinkolommen in nieuwe verzamelbuizen van 2 ml (meegeleverd) en centrifugeer de spinkolommen 1 minuut op maximale snelheid om overgebleven vloeistof te verwijderen.
  18. Plaats de spinkolommen met geopende dop in een schone microcentrifugebuis van 1,5 ml (niet meegeleverd) en incubeer de kolommen 5 minuten bij 60 °C in een verwarmingsblok. Deze stap zorgt voor de verdamping van eventuele resterende vloeistof.
  19. Breng 15 µl Buffer EB (elutiebuffer) rechtstreeks op het midden van ieder spinkolommembraan aan en doe de dopjes voorzichtig dicht.  
**NB:** Zorg ervoor dat u niet met minder dan 15 µl buffer elueert, omdat het eluaatvolume dan te klein zou zijn om verder te kunnen gaan met de qPCR-stap.
  20. Incubeer de spinkolommen 1 minuut bij kamertemperatuur.
  21. Centrifugeer 1 min bij 15.000 x g (12.000 omw/min) om het DNA te elueren.  
**NB:** We raden aan om gezuiverd DNA maximaal 24 uur bij 2–8 °C te bewaren. Wanneer gezuiverd DNA langer dan 24 uur wordt bewaard, raden we aan om het bij –30 tot –15 °C te bewaren.

# Protocol: qPCR met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit moet worden gebruikt met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument\* in combinatie met automatische interpretatie van de resultaten met Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Neem de tijd om bekend te raken met het Rotor-Gene Q MDx-instrument en met versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software voordat u het protocol start. Raadpleeg de gebruikershandleidingen van het instrument, Rotor-Gene AssayManager v2.1 en de Gamma-invoegtoepassing voor meer informatie.

**Belangrijke opmerking:** Als u versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software, de Gamma-invoegtoepassing en het assayprofiel voor het eerst gebruikt, raadpleeg dan het onderdeel "De Rotor-Gene AssayManager-software v2.1 en de Gamma-invoegtoepassing installeren en het assayprofiel importeren" op pagina 52 voor instructies met betrekking tot de installatie. Als versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software, de Gamma-invoegtoepassing en het assayprofiel al zijn geïnstalleerd en in uw computer zijn ingevoerd, ga dan verder met de onderstaande instructies:

## De qPCR instellen

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit bevat producten om acht monsters in maximaal drie runs te testen.

\* Indien van toepassing: Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument met een productiedatum van januari 2010 of later. De productiedatum kunt u afleiden uit het serienummer aan de achterzijde van het apparaat. Het serienummer heeft de vorm "mmjjnnn", waarbij "mm" staat voor de cijfers van de productiemaand, "jj" voor de laatste twee cijfers van het productiejaar en "nnn" de unieke identificatiecode van het apparaat is.

## Wat u moet doen voor u begint

- Koel een laadblok voor 72 buisjes van 0,1 ml gedurende 10 minuten in een vriezer of gedurende minstens 1 uur bij koelkasttemperatuur.
- Ontdooi alle onderdelen van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit en de monsters zo lang als nodig is in een koelkast, op ijs, in een koelblok of bij kamertemperatuur.

**NB:** Controleer in geval van ontdooiing bij kamertemperatuur regelmatig of het materiaal al ontdooid is. Dit geldt in het bijzonder voor de PITX2 RGQ PCR MMx, omdat dit dNTP's bevat die temperatuurgevoelig zijn.

**NB:** PITX2 RGQ PCR PPM dient te worden beschermd tegen zonlicht, omdat het gekleurde nucleotiden bevat.

- Plaats de ontdooidde producten op ijs, in een koelblok of in een koelkast totdat ze na gebruik weer bij  $-30$  tot  $-15$  °C worden geplaatst.

**NB:** *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kitonderdelen kunnen maximaal 6 uur bij  $2-8$  °C worden gehouden, met bescherming tegen licht, als ze op dezelfde dag verschillende keren worden gebruikt.

**NB:** *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kitonderdelen mogen niet meer dan vier cycli van invriezen en ontdooien ondergaan.

- Reinig het gedeelte van de tafel waar u het PCR-mengsel bereidt om het risico van contaminatie van de template of nuclease te verkleinen.
- Voorafgaand aan gebruik dient u de buisjes te vortexen (10–12 seconden) en kort te centrifugeren. Dit geldt niet voor PITX2 RGQ PCR MMx, dat wordt gemengd door op-en-neer te pipetteren omdat het *Taq* Polymerase bevat.

## Procedure

1. Bereid het PITX2 qPCR-reactiemengsel op ijs (of met gebruikmaking van een koelblok) in een buisje van 1,5 of 2 ml (niet meegeleverd), in overeenstemming met het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Het pipetteerschema voor de bereiding van het PITX2-reactiemengsel, dat wordt weergegeven in Tabel 3 (volgende pagina), is zodanig berekend dat na toevoeging van 4 µl bisDNA-monster of controle een eindreactievolume van 20 µl wordt verkregen. Er is extra volume opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten en om de bereiding van een afdoende reactiemengsel voor vier monsters, in duplo getest, plus vier controles mogelijk te maken. Als er minder monsters worden getest, kan het reactiemengsel in overeenstemming hiermee worden bereid. Denk aan het extra volume om rekening te kunnen houden met pipetteerfouten (één extra putje voor maximaal 10 putjes en twee extra putjes voor maximaal 20 putjes).

**Tabel 3. Bereiding van het *therascreen* PITX2 RGQ PCR-reactiemengsel**

Bestanddeel	1 reactie (µl)	Voorbeeld voor een plaat met 12 putjes: 12+2 extra reacties (µl)*
PITX2 RGQ PCR Master Mix	10	140
PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix	6	84
Totaal volume qPCR-reactiemengsel (µl)	16	224
Verdeling qPCR-reactiemengsel	16 µl per buisje	
Verdeling van monsters	4 µl per buisje	
Totaal volume qPCR-reactie	20 µl	

\* Er is een extra reactievolume opgenomen om te kunnen compenseren voor pipetteerfouten: één extra putje voor maximaal 10 putjes en twee extra putjes voor maximaal 20 putjes.

2. Vortex (10–12 seconden) het PITX2 qPCR-reactiemengsel en centrifugeer kort. Plaats de qPCR-strips in een voorgekoeld laadblok voor 72 buisjes en pipetteer 16 µl van het PITX2 qPCR-reactiemengsel per stripbuisje conform het voorbeeld voor de instelling van het laadblok dat in Afbeelding 4 wordt weergegeven.

**NB:** Aanbevolen wordt om de 16 µl van het reactiemengsel te pipetteren door middel van omgekeerd pipetteren.

1	REF50	9	Sample 3	17	NA	25	NA	33	NA	41	NA	49	NA	57	NA	65	NA
2	REFlow	10	Sample 3	18	NA	26	NA	34	NA	42	NA	50	NA	58	NA	66	NA
3	NC	11	Sample 4	19	NA	27	NA	35	NA	43	NA	51	NA	59	NA	67	NA
4	NTC	12	Sample 4	20	NA	28	NA	36	NA	44	NA	52	NA	60	NA	68	NA
5	Sample 1	13	NA	21	NA	29	NA	37	NA	45	NA	53	NA	61	NA	69	NA
6	Sample 1	14	NA	22	NA	30	NA	38	NA	46	NA	54	NA	62	NA	70	NA
7	Sample 2	15	NA	23	NA	31	NA	39	NA	47	NA	55	NA	63	NA	71	NA
8	Sample 2	16	NA	24	NA	32	NA	40	NA	48	NA	56	NA	64	NA	72	NA

**Afbeelding 4.** Instelling van het laadblok voor een experiment met de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit, waarbij vier monsters worden getest. De getallen geven de posities in het laadblok en de uiteindelijke rotorpositie aan. De posities van de controles zijn ingesteld in het PITX2-assayprofiel en kunnen niet worden gewijzigd. Als de controles niet worden geplaatst zoals aangegeven, kan er geen automatische analyse van resultaten worden uitgevoerd. **REF50:** PITX2 RGQ PCR Reference 50; **REFlow:** PITX2 RGQ PCR Reference Low; **NC:** PITX2 RGQ PCR Negative Control, **NTC:** PITX2 RGQ PCR NTC (NTC); **Monster 1 tot 4:** bisDNA-monsters, **NA:** Leeg putje.

3. Vortex (10–12 seconden) de bisDNA-monsters, PITX2 RGQ PCR Reference 50 (Ref50), PITX2 RGQ PCR Reference Low (RefLow), PITX2 RGQ PCR Negative Control (NC) en PITX2 RGQ PCR NTC (NTC), en centrifugeer ze kort.

4. Voeg conform de instelling in Afbeelding 4 4 µl monster of controle materiaal aan het desbetreffende buisje toe voor een totaal volume van 20 µl. Meng voorzichtig door 5 keer op-en-neer te pipetteren.

**NB:** Vervang voor elk buisje de tip, zodat u fout-positieve resultaten ten gevolge van contaminatie door een niet-specifieke template voorkomt.

5. Sluit alle buisjes en controleer of er geen luchtballen onder in de buisjes zitten.

6. Plaats alle onderdelen van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit en de monsters terug in de juiste bewaarcondities om te voorkomen dat het materiaal wordt afgebroken.

---

## De Rotor-Gene MDx voorbereiden

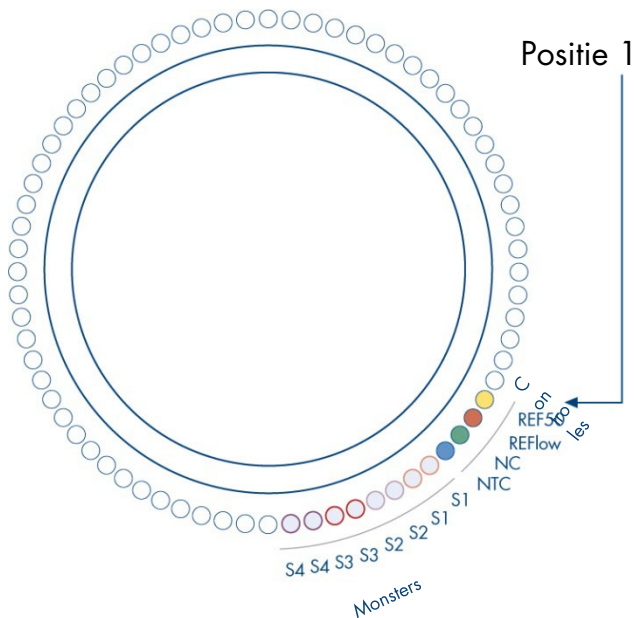
Het wordt sterk aangeraden om de run zo snel mogelijk na de voorbereiding te starten. Als de plaat echter is voorbereid maar niet direct kan worden gestart (vanwege het niet beschikbaar zijn van het apparaat), is het mogelijk om de plaat maximaal 24 uur bij 2–8 °C, beschermd tegen licht, te bewaren (zie “Tijdsbestek tijdens gebruik” op pagina 79).


7. Plaats een rotor met 72 putjes op de Rotor-Gene Q MDx-rotorhouder.
8. Vul de rotor met stripbuisjes die eerder conform de toegewezen posities zijn voorbereid. Start daarbij bij positie 1, zoals aangegeven in afbeelding 5.
9. Vul lege posities met lege, afgesloten buisjes om de rotor helemaal te vullen.

**NB:** Zorg ervoor dat het eerste buisje op positie 1 wordt geplaatst en dat de stripbuisjes in de juiste richting en op de juiste posities worden geplaatst (dit is belangrijk voor de geldigheid van de run en de traceerbaarheid van de monsters), zoals weergegeven in afbeelding 5.

**NB:** Houd de vier controles (REF50, REFlow, NC en NTC) altijd in de posities 1 tot 4, zodat de gainoptimalisatie (uitgevoerd op buisjespositie 1) altijd met dezelfde amplificatie wordt uitgevoerd. Zorg ervoor dat de controles in de juiste volgorde worden geladen voor de automatische analyse van de controles (een omkering van de controles zal de run ongeldig maken aan de hand van het PITX2-assayprofiel).





**Afbeelding 5. Instelling van de rotor voor een experiment met de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit.** REF50: PITX2 RGQ PCR Reference 50; REFLOW: PITX2 RGQ PCR Reference Low; NC: PITX2 RGQ PCR Negative Control, NTC: PITX2 RGQ PCR NTC (NTC); S1 tot S4: bisDNA-monsters. NB: Alle resterende posities  dienen te worden gevuld met lege buisjes.

10. Maak de vergrendelingsring vast.

11. Plaats de rotor en vergrendelingsring in het Rotor-Gene Q MDx-instrument. Sluit het deksel van het instrument.

Een werklĳst aanmaken en de qPCR-run starten

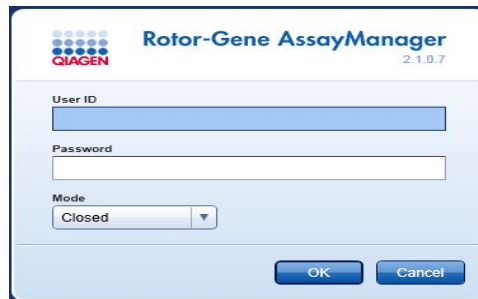
**NB:** U kunt de werklĳst maken en opslaan voordat u de monsters bereidt of zodra het experiment is ingesteld in het instrument, zoals beschreven in deze handleiding.

12. Schakel het Rotor-Gene Q MDx-instrument in.

13. Open de Rotor-Gene AssayManager-software door te klikken op het pictogram:



Het venster van de Rotor-Gene AssayManager wordt geopend (afbeelding 6).



Afbeelding 6. Aanmeldscherm van de Rotor-Gene AssayManager.

14. Meld u aan als gebruiker met de rol "Operator" in de gesloten modus. Klik op "OK".

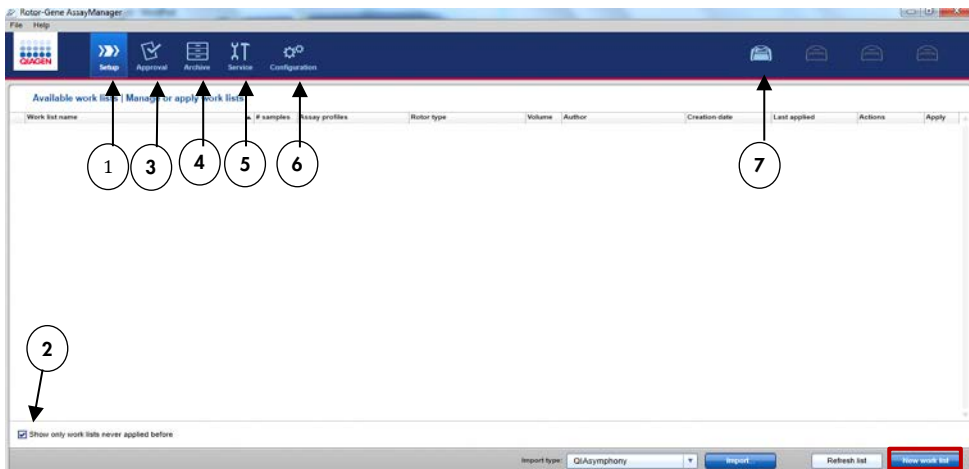
Het scherm van de Rotor-Gene AssayManager wordt geopend (Afbeelding 7 op de volgende pagina).

15. Controleer of de RGQ op de juiste manier door de software wordt gedetecteerd alvorens u de run start.



16. Selecteer het tabblad "Setup" (instellen).

**NB:** De algehele functies van de omgeving Setup en van "Creating/Editing a Work List" (een werklĳst maken/bewerken) worden beschreven in de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1).

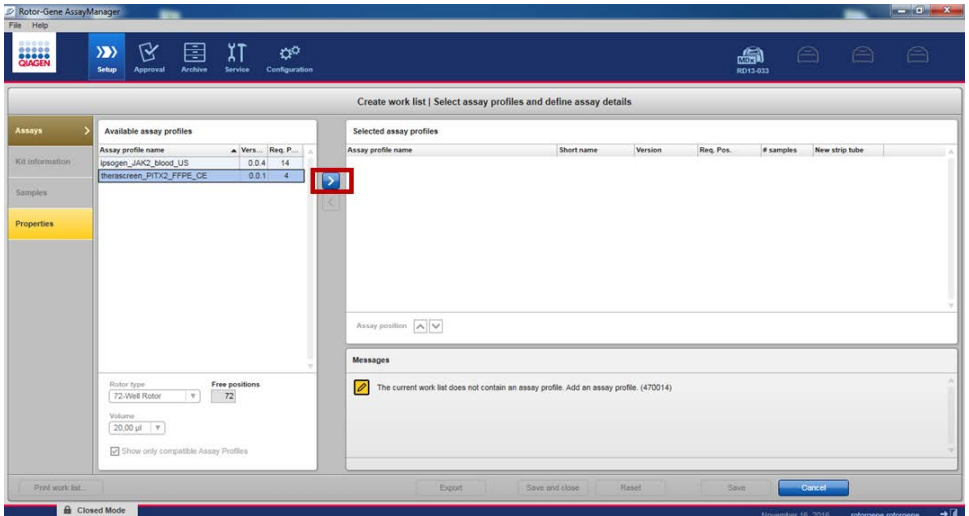
17. Klik op "New work list" (nieuwe werklĳst) (Afbeelding 7).



**Afbeelding 7. Beschrijving van de verschillende tabbladen in de RGAM-software.**

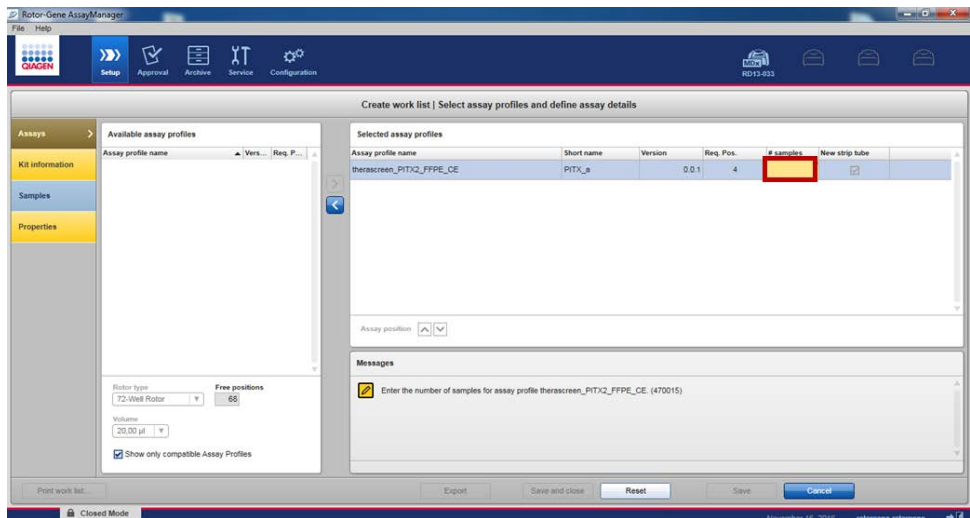
- |   |  |
|---|--|
| <p>1 Tabblad Setup. Met dit tabblad kunnen werklijsten worden beheerd of toegepast.</p> <p>2 Aanvinken toegepaste werklijsten. Toont alleen nieuwe werklijsten. Een "toegepaste werklijst" werd reeds uitgevoerd.</p> <p>3 Tabblad Approval (goedkeuring). Met dit tabblad kunt u eerdere experimenten vinden.</p> <p>4 Tabblad Archive (archieef). Hiermee kunt u oude experimenten vinden die al waren goedgekeurd.</p> | <p>5 Tabblad Service. Toont een rapport van een verificatiespoor voor ieder bestand dat door de software is gegenereerd.</p> <p>6 Tabblad Configuration (configuratie). Maakt de configuratie van alle softwareparameters mogelijk.</p> <p>7 Pictogrammen Rotor-Gene Q MDx (RGQ):</p> <p> Niet aangesloten       Aangesloten</p> |
|---|--|

18. Selecteer het PITX2-assayprofiel uit de lijst met beschikbare assayprofielen (afbeelding 8).



Afbeelding 8. Importeren assayprofiel.

19. Breng het geselecteerde assayprofiel over naar de lijst met geselecteerde assayprofielen door op de pijl (aan de rechterkant van de naam van het assayprofiel) te klikken. Het assayprofiel wordt nu weergegeven in de lijst met geselecteerde assayprofielen (afbeelding 8).
20. Vul in het tabblad "Assays" de gele velden in: Aantal monsters (maximaal 8) in overeenstemming met de instelling van uw plaat (Afbeelding 9).
- NB:** Het aantal monsters komt niet overeen met het aantal putjes en omvat geen controles. Monsters worden in duplo getest; daarom komt één monster overeen met twee putjes. Het aantal monsters dat moet worden ingevoerd is bijvoorbeeld 4 voor de plaat met 12 putjes die in Afbeelding 4 (pagina 39) wordt weergegeven.



Afbeelding 9. Invoeren van het aantal monsters.

21. Selecteer het tabblad “Kit Information” (informatie over de kit). Voer de kitinformatie in door “Use kit bar code” (gebruik de streepjescode van de kit) te selecteren (en vervolgens de streepjescode te scannen) of door “Enter kit information manually” (voer de informatie over de kit handmatig in) te selecteren, en de kitinformatie op het etiket van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kitdoos handmatig in te voeren:

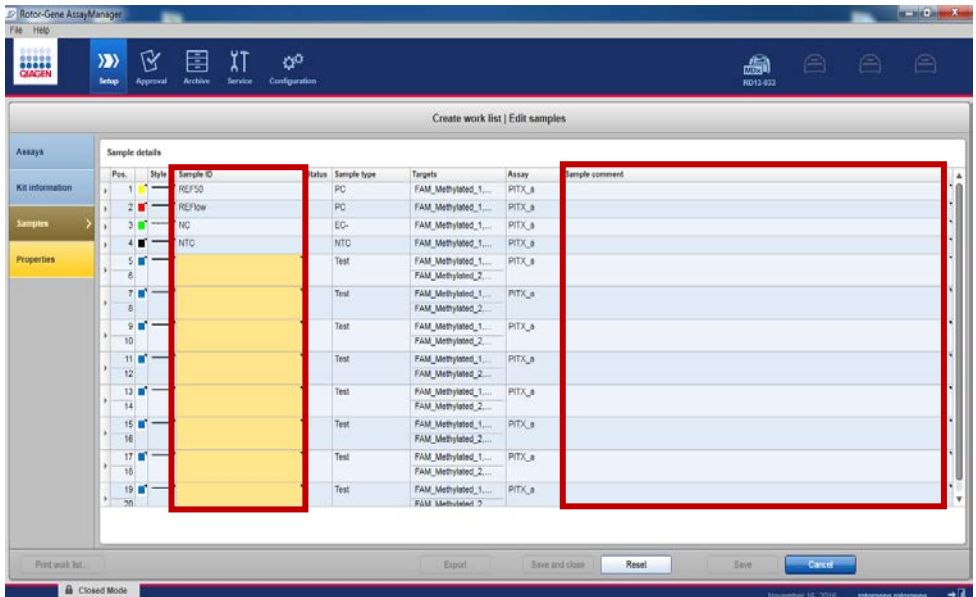
**MAT** Materiaalnummer

 Vervaldatum

**LOT** Partijnummer

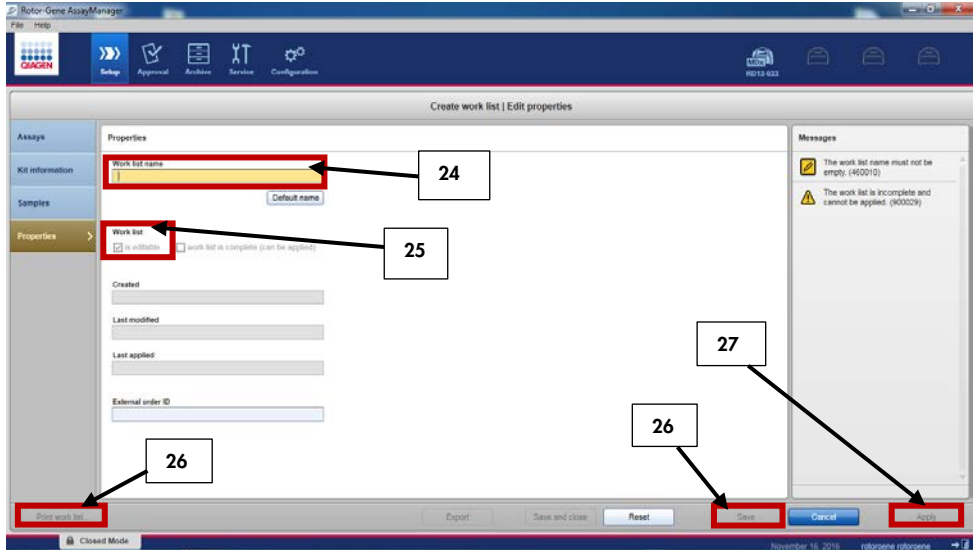
22. Selecteer het tabblad “Samples” (monsters). Er wordt een lijst met monsterdetails weergegeven. Deze lijst staat voor de verwachte indeling van de rotor.

23. Voer de monsteridentificaties in, alsook eventuele extra informatie en opmerkingen over de monsters (afbeelding 10).



Afbeelding 10. Instelling monsters.

24. Selecteer "Properties" (eigenschappen) en voer een naam voor de werklIJst in (afbeelding 11).



Afbeelding 11. Aanmaken van de werklIJst.

25. Schakel het selectievakje "worklist is complete (can be applied)" (werklIJst is volledig (kan worden toegepast)) in.

26. Sla de werklIJst op.

**Optioneel:** Druk op "Print work list" (werklIJst afdrukken) om de werklIJst af te drukken. Een afgedrukte werklIJst kan handig zijn bij het voorbereiden en instellen van de run. De monsterdetails maken deel uit van de werklIJst.

27. Selecteer de desbetreffende werklIJst in het werklIJstoverzicht en klik op "Apply" (toepassen). Als de werklIJst nog open is, kunt u direct op "Apply" klikken.

**NB:** Controleer of de Rotor-Gene Q MDx op de juiste manier door de software wordt gedetecteerd alvorens u de run start.

28. Voer een naam in voor het experiment.

---

29. Selecteer in het gedeelte “Cycler Selection” (cycler selecteren) de cycler die u wilt gebruiken.

**NB:** Gebruik een Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-cycler.

30. Controleer of de vergrendelingsring correct is bevestigd en bevestig op het scherm dat de vergrendelingsring is bevestigd.

31. Klik op “Start run” (run starten). De qPCR-run start.

### qPCR-resultaten vrijgeven en rapporteren

De algemene functionaliteit van de omgeving Approval wordt beschreven in de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Gebruikershandleiding van de Gamma-invoegtoepassing voor Rotor-Gene AssayManager v2.1).

Als een run is beëindigd en de cycler is vrijgegeven, wordt het experiment opgeslagen in de interne database. De analyse van de verkregen gegevens wordt automatisch uitgevoerd volgens de door het assayprofiel gedefinieerde regels en parameterwaarden.

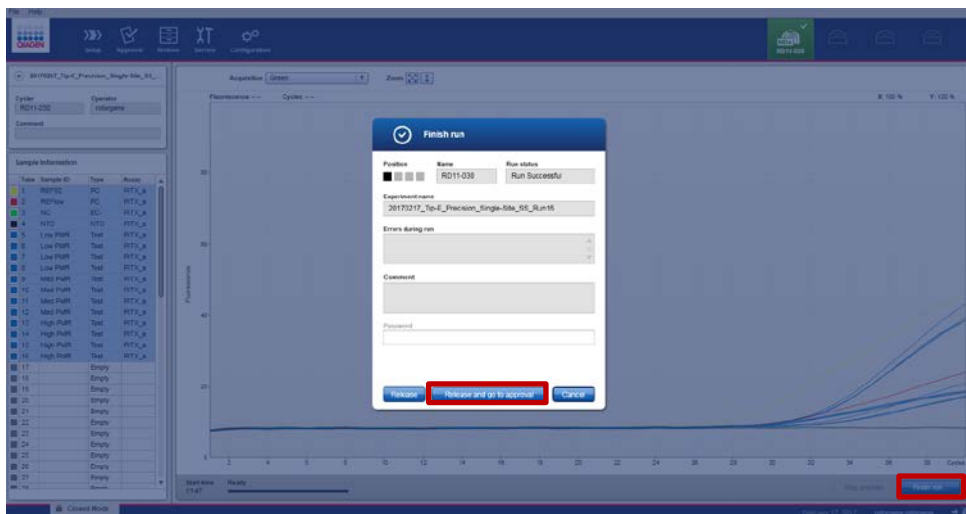
**NB:** Een gebruiker moet de rol “Approver” (goedkeurder) hebben om een run te kunnen goedkeuren.

1. Zodra de run is voltooid, klikt u op “Finish run” (run beëindigen) om de gegevens te analyseren en exporteren.

**NB:** Het experiment wordt pas opgeslagen in de interne database wanneer deze stap is voltooid.

2. Na op “Finish run” te hebben geklikt voert u het wachtwoord in en klikt u op “Release and go to approval” (vrijgeven en naar goedkeuring gaan) (Afbeelding 12).





Abbeelding 12. Afronding van de run.

Een gebruiker die is aangemeld met de rol "Approver" kan klikken op "Release and go to approval".

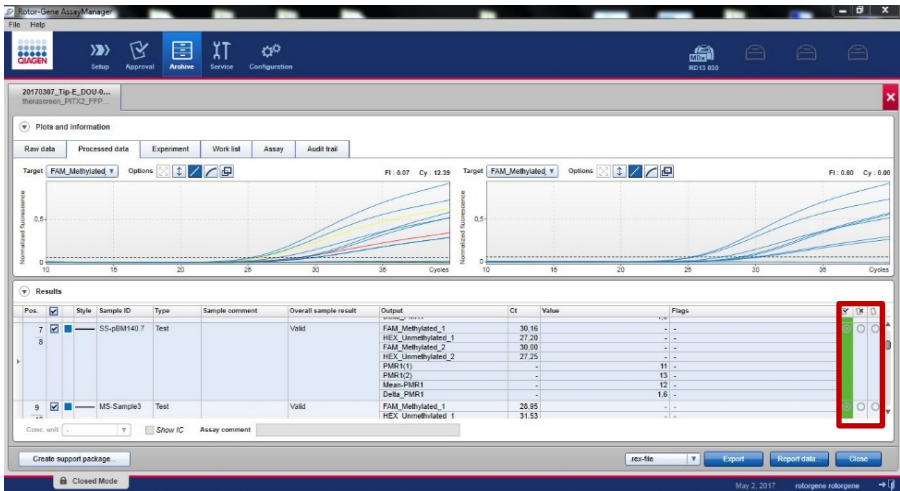
Een gebruiker die is aangemeld met de rol "Operator" kan klikken op "Release" (vrijgeven).

Als op "Release and go to approval" is geklikt, worden de resultaten van het experiment weergegeven in de omgeving "Approval".

Als op "Release" is geklikt door een gebruiker met de rol "Operator", dient iemand met de rol "Approver" zich aan te melden en de omgeving "Approval" te selecteren.

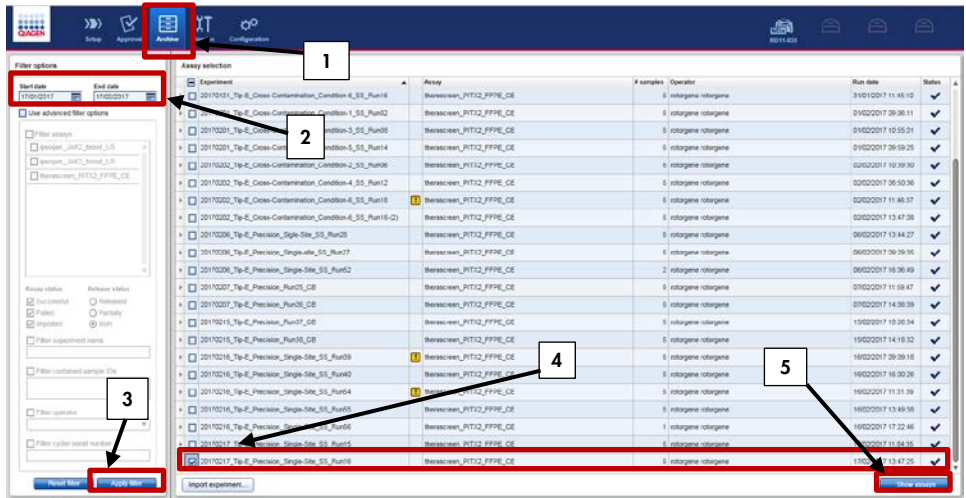
**NB:** In het tabblad "Approval" kunnen experimenten worden geanalyseerd door te wisselen tussen ieder tabblad (d.w.z. experiment, assay, verificatiespoor, controleresultaten van de run).

3. Controleer de amplificatiecurven voor ieder monster, vink het eerste vakje aan de rechterkant van de kolom "flags" (waarschuwingsberichten) aan (het vakje wordt groen) (afbeelding 13).



Afbeelding 13. Controleren van de amplificatiecurven.

- Klik op "Release/report data" (gegevens vrijgeven/rapporteren) (rechtsonder in het venster) om een .pdf-rapport te maken en het LIMS-bestand op te slaan (er wordt automatisch een kopie opgeslagen in C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Reports).
- Sluit het pdf-bestand en ga terug naar de Rotor-Gene AssayManager. Klik telkens wanneer dat wordt gevraagd op "OK".
- Ga naar het tabblad "Archive" om het .rex-bestand te exporteren. Controleer of de "start date" (startdatum) en "end date" (einddatum) juist zijn en klik op "apply filter" (filter toepassen). Selecteer het experiment dat u wilt exporteren en klik vervolgens op "Show assays" (assays weergeven) (afbeelding 14).



Afbeelding 14. Exporteren van de rungegevens.

7. Exporteer het .rex-bestand (het bestand wordt opgeslagen in C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Experiments).

**NB:** De software heeft automatisch een LIMS-bestand gegenereerd in C:\Documents and settings\All Users\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\LIMS

8. Maak het Rotor-Gene Q MDx-instrument weer leeg en gooi de stripbuisjes weg conform de lokale veiligheidsvoorschriften.

**NB:** Om te kunnen helpen met het oplossen van problemen, heeft de technische ondersteuning van QIAGEN een ondersteuningspakket van de run nodig. U kunt een ondersteuningspakket genereren in de omgeving "Approval" of "Archive". Zie "Creating a support package" (een ondersteuningspakket maken) in de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* voor meer informatie.

Naast het ondersteuningspakket kan het verificatiespoor vanaf het moment van het voorval  $\pm 1$  dag handig zijn. Het verificatiespoor kunt u downloaden in de omgeving "Service". Zie de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* voor meer informatie.

---

De Rotor-Gene AssayManager-software v2.1 en de Gamma-invoegtoepassing installeren en het assayprofiel importeren


Versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software moet geïnstalleerd zijn op de computer die is aangesloten op de Rotor-Gene Q MDx. De software kunt u downloaden bij "Operating Software" (besturingssoftware) onder het tabblad "Product Resources" (hulpbronnen product) van de productpagina van Rotor-Gene AssayManager v2.1: [www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager\\_v2\\_1.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx).

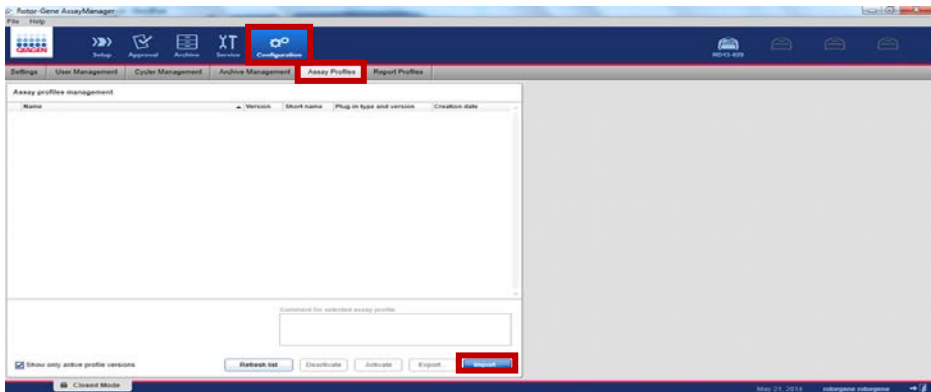
Voor meer informatie over de installatie van de Rotor-Gene AssayManager-basissoftware v2.1 raadpleegt u de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual*. Voor meer informatie over aanvullende software op aangesloten computers raadpleegt u de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide* (Beknopte handleiding voor Rotor-Gene AssayManager v2.1).

Voor automatische interpretatie van de resultaten met de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit met Rotor-Gene AssayManager v2.1 moet de nieuwste Gamma-invoegtoepassing zijn geïnstalleerd op uw Rotor-Gene AssayManager v2.1. Zie de "Product Resources" van de productpagina van Rotor-Gene AssayManager v2.1: [www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager\\_v2\\_1.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx) waar u de nieuwste versie van de invoegtoepassing vindt.

Voor de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit is bovendien een assayprofiel nodig. Dit assayprofiel bevat alle parameters die nodig zijn voor het uitvoeren van de cyclus en het analyseren van de PITX2-assay. Deze parameters worden vergrendeld voor de run. Het PITX2-assayprofiel (AP\_therascreen\_PITX2\_FFPE\_CE) komt overeen met een ".iap"-bestand dat u van de productpagina van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit kunt downloaden: [www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/therascreen-pitx2-rgq-pcr-kit-ce/](http://www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/therascreen-pitx2-rgq-pcr-kit-ce/) op het tabblad "Product Resources" onder "Protocol Files" (protocolbestanden). Het assayprofiel moet worden geïmporteerd in versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software.

Hieronder staan de details over het installeren van de Gamma-invoegtoepassing en het importeren van het assayprofiel in de Rotor-Gene AssayManager-software v2.1.

1. Download de Gamma-invoegtoepassing van **www.qiagen.com**.
2. Start de installatie door te dubbelklikken op het bestand GammaPlugin.Installation.msi. Volg de installatie-instructies op het scherm. Voor een gedetailleerde beschrijving van dit proces raadpleegt u het gedeelte "Installing plug-ins" (invoegtoepassingen installeren) in de *AssayManager Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de AssayManager-basistoepassing).
3. Nadat de invoegtoepassing is geïnstalleerd, moet iemand met beheerdersrechten voor de Rotor-Gene AssayManager-software het vereiste assayprofiel als volgt importeren:
4. Ga naar Windows Explorer en sla het assayprofiel in het volgende bestand op:  
"C:\Documents and Settings\All Users\Documents\QIAGEN\  
Rotor-GeneAssayManager\Import\AssayProfiles".
5. Open de Rotor-Gene AssayManager-software door te klikken op het  pictogram.
6. Meld u aan bij Rotor-Gene AssayManager met uw gebruikersidentificatie en wachtwoord. Zorg ervoor dat u de "Closed mode" (gesloten modus) niet wijzigt. Klik op "OK". Het scherm van de Rotor-Gene AssayManager wordt geopend.
7. Selecteer de configuratieomgeving (Afbeelding 15).



Afbeelding 15. Tabblad Configuration.

- 
8. Selecteer het tabblad "Assay Profiles" (assayprofielen).
  9. Klik op "Import" (importeren).
  10. Selecteer in het dialoogvenster het assayprofiel  
AP\_therascreen\_PITX2\_FFPE\_CE\_V1.0.x.iap (waarbij x = 1 of hoger) dat u wilt importeren en klik op "Open" (openen).
  11. Zodra het assayprofiel is geïmporteerd kan het worden gebruikt in de omgeving "Setup".

---

# Interpretatie van de resultaten

## Gegevensanalyse

De analyse van de resultaten van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit voor iedere controle en ieder monster wordt automatisch uitgevoerd door de Rotor-Gene AssayManager v2.1 met de Gamma-invoegtoepassing v1.0 en het PITX2-assayprofiel, hierna het PITX2 Assay Package (PITX2-assaypakket) genoemd.

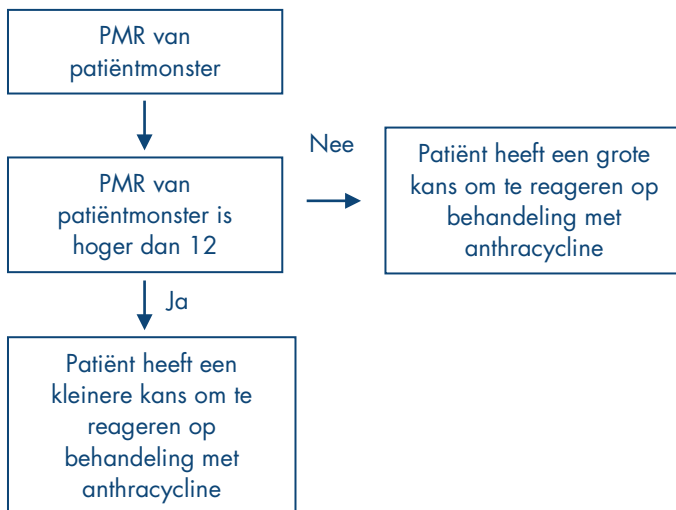
Het PITX2 Assay Package analyseert amplificatiecurven en kan niet-overeenstemmende curven ongeldig verklaren, afhankelijk van de vorm en ruisamplitude. Als dit het geval is, wordt de ongeldige curve gemarkeerd. Er kunnen ook waarschuwingen worden weergegeven voor afwijkingen die de curve niet ongeldig maken (zie de lijst met waarschuwingsberichten en bijzonderheden hierover in het onderdeel “Waarschuwingsberichten” op pagina 61).

Om de geldigheid van de assay vast te stellen analyseert het PITX2 Assay Package ook de runcontroles, d.w.z. PITX2 RGQ PCR Reference 50 (REF50), PITX2 RGQ PCR Reference Low (REFlow), PITX2 RGQ PCR Negative Control (NC) en PITX2 RGQ PCR NTC (NTC). Of een controle geldig is hangt af van de overeenstemming van de  $C_T$ - en/of PMR-waarden met vooraf gedefinieerde specificaties (zie “Algehele resultaten van monsters” op pagina 59 en “Waarschuwingsberichten” op pagina 61).

**NB:** Als minstens één controle ongeldig is, worden de resultaten van alle testmonsters als ongeldig beschouwd en worden er geen PMR-resultaten weergegeven.

Het PITX2 Assay Package analyseert de monsters ook door de geldigheid van de duplicaten en de geldigheid van de invoer te controleren (zie “Algehele resultaten van monsters” op pagina 59 en “Waarschuwingsberichten” op pagina 61). Ten slotte wordt een PMR-waarde zonder cijfers aan de monsters toegekend door berekening van het gemiddelde van de twee PMR-resultaten die voor ieder monsterduplicaat zijn verkregen. De PMR die voor ieder

patiëntmonster is verkregen zal voor de behandelend arts informatie opleveren over de waarschijnlijkheid dat een patiënt zal reageren op chemotherapie die gebaseerd is op anthracycline. Als de verkregen PMR gelijk aan of lager dan 12 is, zal de patiënt waarschijnlijk reageren op chemotherapie die gebaseerd is op anthracycline. Als de verkregen PMR daarentegen hoger dan 12 is, kan er een alternatieve behandeling worden voorgesteld omdat de patiënt een kleinere kans heeft om te reageren op chemotherapie die gebaseerd is op anthracycline (afbeelding 16).



Afbeelding 16. Interpretatie van PMR-resultaten van patiëntmonsters voor de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit.

De resultaten van de testmonsters die automatisch zijn geanalyseerd en ingesteld door het PITX2 Assay Package, moeten worden goedgekeurd en vrijgegeven door een gebruiker die is aangemeld met de rol "Approver". Er staan bij monsterresultaten die moeten worden goedgekeurd drie extra goedkeuringsknoppen aan het einde van de bijbehorende rij. Met deze knoppen kunnen de monsterresultaten interactief worden geaccepteerd of afgekeurd. Raadpleeg de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* voor meer informatie.



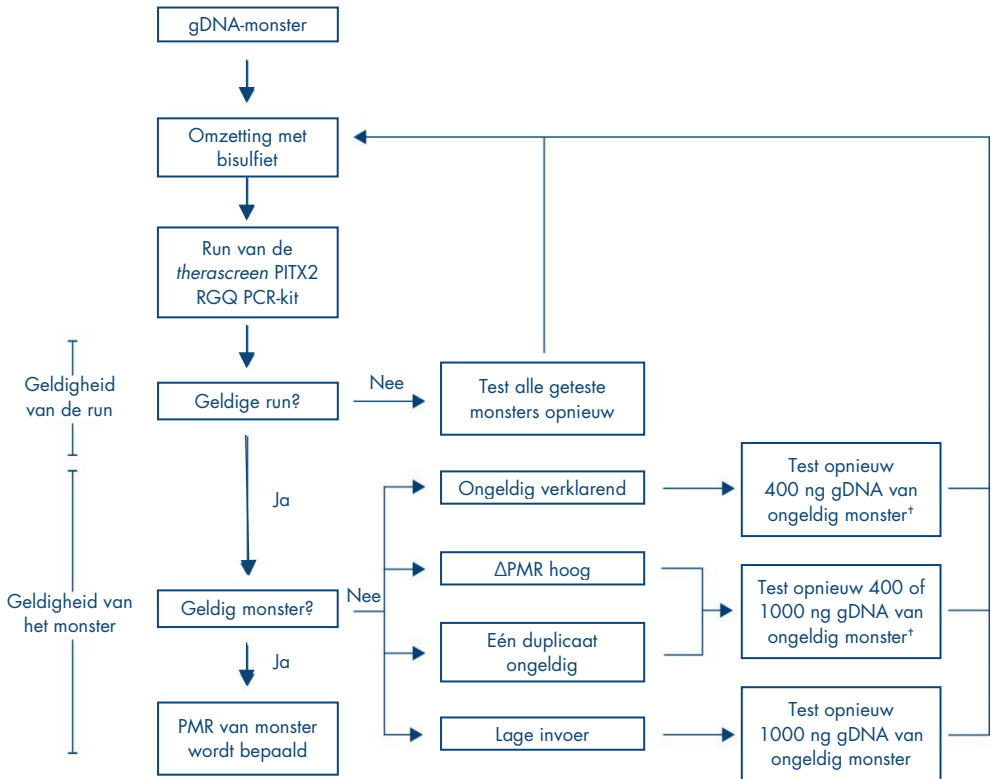
---

**Opmerking werkstroomcontrole:** Het monster HD216 (werkstroomcontrole) dient een PMR-waarde tussen 30 en 50 op te leveren. Als met deze werkstroomcontrole deze PMR wordt verkregen, kunnen zowel de gDNA-zuivering als de stap van omzetting met bisulfiet geldig worden verklaard.

Raadpleeg in geval van ongeldige resultaten “Problemen oplossen” op pagina 67.

### Hertests

In geval van ongeldige resultaten zijn hertests vereist. Als de assay ongeldig is, d.w.z. één van de vier controles is ongeldig, dan moet de gehele run, inclusief alle geteste monsters, opnieuw worden getest. Als de assay geldig is maar één monster of enkele monsters zijn ongeldig, dan moet/moeten het/de ongeldige monster(s) opnieuw worden getest nadat het type fout is onderzocht (zie “Waarschuwingsberichten” op pagina 61, Tabel 6 en Tabel 7 op pagina 62–63). Een werkstroom van de hertestprocedure wordt weergegeven in afbeelding 17.



**Afbeelding 17. Werkstroom voor hertests voor de *theascreen* PITX2 RGQ PCR-kit.**

\* Zie Tabel 6 en Tabel 7 op pagina 62–63.

† Er kan een invoer van 200 ng worden gebruikt als er niet voldoende gDNA beschikbaar is; het risico op een ongeldig resultaat als gevolg van de waarschuwing “Low input” is dan echter verhoogd.

---

## Weergave van resultaten

### Doelen en gecombineerde doelen

De resultaten voor iedere reactie van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit worden weergegeven onder de volgende namen voor doelen en gecombineerde doelen:

- "FAM\_Methylated\_1": Resultaten van groene kanalen voor alle controles en voor duplicaat 1 van testmonsters.
- "FAM\_Methylated\_2": Resultaten van groene kanalen voor duplicaat 2 van testmonsters.
- "HEX\_Unmethylated\_1": Resultaten van gele kanalen voor alle controles en voor duplicaat 1 van testmonsters.
- "HEX\_Unmethylated\_2": Resultaten van gele kanalen voor duplicaat 2 van testmonsters.
- "PMR": Deze doelen betreffen gecombineerde doelen; met het bijbehorende resultaat wordt rekening gehouden met de geldigheid van de controles. Deze doelen worden weergegeven voor alle controles en testmonsters indien ze geldig zijn.
- "Mean\_PMR": Deze doelen betreffen gecombineerde doelen; met het bijbehorende resultaat wordt rekening gehouden met de geldigheid van de controles. Deze doelen worden weergegeven voor alle testmonsters indien ze geldig zijn.

### Algehele resultaten van monsters

De conclusie van de analyse voor iedere controle en ieder monster wordt weergegeven in de kolom "Overall Sample Result" (algeheel resultaat van monster) van het rapport (Tabel 4).

**Tabel 4. Algehele resultaten van monsters en acties**

<b>Algeheel resultaat van monster</b>	<b>Monstertype</b>	<b>Beschrijving</b>	<b>Actie</b>
Geldig	REF50, REFlow, NC, NTC en testmonster*	Controle of testmonster is geldig	n.v.t.
Ongeldig†	REF50, REFlow, NC, NTC en testmonster	Controle is ongeldig	Herhaal de gehele run
Ongeldig	Testmonster	Testmonster is ongeldig	Stel een nieuwe run in om het/de ongeldige monster(s) opnieuw te runnen
Ongeldig, één duplicaat ongeldig	Testmonster	Als één van de doelen (FAM_Methylated_1, FAM_Methylated_2, HEX_Unmethylated_1 of HEX_Unmethylated_2) ongeldig is, wordt het monster als ongeldig beschouwd	Stel een nieuwe run in om het/de ongeldige monster(s) opnieuw te runnen
Ongeldig, delta-PMR hoog‡	Testmonster	Als de delta-PMR-waarde tussen het eerste duplicaat en het tweede duplicaat hoger dan een specifieke waarde§ is, wordt het monster als ongeldig beschouwd	Stel een nieuwe run in om het/de ongeldige monster(s) opnieuw te runnen

\* De interpretatie van geldige PMR-resultaten van testmonsters is eerder uitgelegd (zie afbeelding 16).

† Wanneer controles ongeldig zijn, worden de ongeldige C<sub>T</sub>-waarden en PMR-resultaten ter kennisgeving tussen vierkante haakjes weergegeven.

‡ Wanneer een monster door een hoge delta-PMR ongeldig is, worden de C<sub>T</sub>-waarden en de PMR-resultaten van beide duplicaten en de gemiddelde PMR ter kennisgeving weergegeven. Het monster moet echter opnieuw worden getest om een geldig resultaat te verkrijgen.

§ De specifieke waarde varieert in overeenstemming met de PMR-waarde die voor ieder monster is verkregen (zie Tabel 5 op de volgende pagina).

Tabel 5. Criteria voor delta-PMR

Gemiddelde - PMR	Delta-PMR-duplicaten
0-1	$\leq 1$
1-5	$\leq 5$
5-10	$\leq 7$
10-15	$\leq 9$
15-35	$\leq 13$
35-65	$\leq 15$
65-85	$\leq 18$
85-100	$\leq 6$

## Waarschuwingenberichten

Waarschuwingen worden weergegeven om extra informatie over de verkregen resultaten te geven, met name over ongeldige resultaten. Afwijkingen die geen problemen vormen, kunnen een waarschuwing genereren zonder dat deze tot een ongeldig resultaat leidt. Raadpleeg de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* voor informatie over universele waarschuwingen.

De automatische analyse van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit assay kan zowel assayspecifieke waarschuwingen (Tabel 6 op de volgende pagina) als algemene waarschuwingen (Tabel 7 op pagina 63) opleveren.

**Tabel 6. Assayspecifieke waarschuwingen**

Assayspecifieke waarschuwing	Monstertype	Beschrijving	Actie
<b>Assayspecifieke waarschuwingen voor controles</b>			
BELOW_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFlow	Het PMR-resultaat is lager dan het geaccepteerde bereik (<36 voor REF50, <2 voor REFlow).	Herhaal de gehele run
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFlow	Het PMR-resultaat is hoger dan het geaccepteerde bereik (>65 voor REF50, >13 voor REFlow).	Herhaal de gehele run
NO_SIGNAL	REF50	De C <sub>T</sub> -waarde van het doel FAM_Methylated_1 en/of HEX_Unmethylated_1 is >32	Herhaal de gehele run
NO_SIGNAL	REFlow	De C <sub>T</sub> -waarde van het doel HEX_Unmethylated_1 is >32	Herhaal de gehele run
<b>Assayspecifieke waarschuwingen voor testmonsters</b>			
PMR_ABOVE_OR_EQUAL_92*	Testmonster	Het PMR-resultaat is hoger dan de Limit of Detection (detectielimiet) die is vastgesteld voor de probe gericht op vroegere niet-gemethyleerde sequenties. Dit waarschuwingsbericht zorgt niet voor ongeldigverklaring; het is een waarschuwing.	Geen
PMR_BELOW_OR_EQUAL_4*	Testmonster	Het PMR-resultaat is lager dan de Limit of Detection die is vastgesteld voor de probe gericht op vroegere gemethyleerde sequenties. Dit waarschuwingsbericht zorgt niet voor ongeldigverklaring; het is een waarschuwing.	Geen
LOW_INPUT_RETEST_NEEDED	Testmonster	De C <sub>T</sub> -waarde van het doel FAM_Methylated_1 en HEX_Unmethylated_1 of FAM_Methylated_2 en HEX_Unmethylated_2 is >32,5	Verhoog de gDNA-invoer bij de omzetting met bisulfit en herhaal de run

\* Aangezien PMR-resultaten zonder cijfer worden gegeven maar de software de PMR berekent met een cijfer, kan de waarschuwing Limit of Detection al dan niet aanwezig zijn voor een waarde bij de PMR-limiet, d.w.z. 4 en 92. Waarschuwingsberichten zijn inderdaad aanwezig bij PMR-resultaten >92 en <4; een PMR-resultaat van bijvoorbeeld 4,1 of 91,8 afgerond op respectievelijk 4 en 92 zal dus niet worden gemarkeerd als respectievelijk lager of hoger dan de detectielimiet.

**NB:** Alle hierboven weergegeven waarschuwingsberichten leiden tot ongeldigverklaring, behalve de twee die betrekking hebben op de Limit of Detection. Wanneer duplicaten ongeldig zijn worden de C<sub>T</sub>-waarden ter kennisgeving tussen vierkante haakjes weergegeven, maar het ongeldige PMR-resultaat wordt niet weergegeven. Ook de gemiddelde PMR van beide duplicaten wordt niet weergegeven.

---

**Tabel 7. Algemene waarschuwingen**

Algemene waarschuwing	Gedrag	Beschrijving	Actie
CONSECUTIVE_FAULT	Ongeldig	Een doel dat voor de berekening van dit doel is gebruikt, is ongeldig.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit te wijten is aan de ongeldigheid van een controle.
ASSAY_INVALID	Ongeldig	De assay is ongeldig omdat ten minste één controle ongeldig is.	Herhaal de gehele run.
ANALYSIS_FAILED	Ongeldig	Assay is ingesteld als ongeldig, omdat de analyse om verschillende redenen is mislukt.	Neem contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Ongeldig	De met de onbewerkte gegevens gemaakte amplificatiecurve heeft een vorm die afwijkt van het gangbare gedrag voor deze assay. Er is een grote kans dat er sprake is van incorrecte resultaten of incorrecte interpretatie van resultaten.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.
FLAT_BUMP	Ongeldig	De met de onbewerkte gegevens gemaakte amplificatiecurve heeft de vorm van een platte bobbel, wat afwijkt van het gangbare gedrag voor deze assay. Er is een grote kans dat er sprake is van incorrecte resultaten of incorrecte interpretatie van resultaten (zoals een onjuist vastgestelde $C_T$ -waarde).	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.
INVALID_CALCULATION	Ongeldig	De berekening voor dit doel is mislukt.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Waarschuwing	Het percentage fluorescentiewijziging van dit monster ten opzichte van het monsterbuisje met de grootste fluorescentiewijziging is kleiner dan een opgegeven limiet.	Geen
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Waarschuwing	De reactie-efficiëntie voor dit monster heeft een opgegeven limiet niet bereikt.	Geen
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Ongeldig	De amplificatiecurve overschrijdt meer dan eens de drempelwaarde. Er kan geen duidelijke $C_T$ worden vastgesteld.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.



NO_BASELINE	Ongeldig	Er is geen basisniveau gevonden. Er kan geen verdere analyse worden uitgevoerd.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.
RUN_FAILED	Ongeldig	De assay is ingesteld als ongeldig vanwege een probleem met de cyclus of de aansluiting van de cyclus.	Herhaal de gehele run.
RUN_STOPPED	Ongeldig	De assay is ingesteld als ongeldig, omdat de run handmatig is gestopt.	Herhaal de gehele run.
SATURATION	Ongeldig	De fluorescentie op basis van de onbewerkte gegevens raakt sterk verzadigd vóór het buigpunt van de amplificatiecurve.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.
SATURATION_IN_PLATEAU	Waarschuwing	De fluorescentie op basis van de onbewerkte gegevens raakt verzadigd in de plateau fase van de amplificatiecurve.	Geen
SPIKE	Waarschuwing	Er is in de fluorescentie van de onbewerkte gegevens een piek gedetecteerd in de amplificatiecurve, maar buiten het gebied waar de $C_T$ wordt bepaald.	Geen
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Ongeldig	Er is in de amplificatiecurve een piek gedetecteerd dicht bij de $C_T$ .	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.
STEEP_BASELINE	Ongeldig	Er is in de amplificatiecurve een snelle stijging in het basisniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van de onbewerkte gegevens.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.
STRONG_BASELINE_DIP	Ongeldig	Er is in de amplificatiecurve een sterke daling in het basisniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van de onbewerkte gegevens.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.
STRONG_NOISE	Ongeldig	Er is een sterke ruis gedetecteerd buiten de groeifase van de amplificatiecurve.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.

STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Ongeldig	Er is een sterke ruis gedetecteerd in de groeifase (exponentiële fase) van de amplificatiecurve.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Ongeldig	Er is in de amplificatiecurve een golvend basisoniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van de onbewerkte gegevens.	Herhaal de run van het monster of de gehele run als dit wordt waargenomen bij een controle.

**NB:** Voor monsterduplicaten met een ongeldig verklarend waarschuwingsbericht worden de  $C_T$ -waarden ter kennisgeving tussen vierkante haakjes weergegeven, maar het ongeldige PMR-resultaat wordt niet weergegeven. Ook de gemiddelde PMR van beide duplicaten wordt niet weergegeven.

# Problemen oplossen

Dit gedeelte over problemen oplossen kan handig zijn om eventuele problemen op te lossen die zich kunnen voordoen bij de bepaling van PMR in de PITX2-promotor 2 met behulp van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit. De wetenschappers bij de afdeling Technical Services van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en/of protocollen in deze handleiding of over monster- en assaytechnologieën (ga voor contactgegevens naar [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Raadpleeg de desbetreffende handleidingen voor informatie over het oplossen van problemen met betrekking tot de Deparaffinization Solution (cat.nr. 19093), de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit (cat.nr. 60404) en de EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit (cat.nr. 59824 of 59826).

Voor informatie over het oplossen van problemen met het Rotor-Gene Q MDx-instrument en versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software raadpleegt u de desbetreffende gebruikershandleidingen.

## Opmerkingen en suggesties

---

### Lage opbrengst van gDNA

De hoeveelheid gezuiverd gDNA is lager dan de 400 ng die wordt aanbevolen voor de gehele werkstroom van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit

Er kan een invoer van 200 ng worden gebruikt; het risico op een ongeldig resultaat als gevolg van de waarschuwing "Low input" is dan echter verhoogd.

### Assay ongeldig vanwege ongeldige REFlow en/of REF50

a) Eén bestanddeel van het reactiemengsel niet toegevoegd

Controleer of het reactiemengsel op de juiste wijze is bereid (Tabel 3 op pagina 38). Controleer of alle bestanddelen van het qPCR-reactiemengsel zijn toegevoegd. Herhaal de PCR-run.

### Opmerkingen en suggesties

- 
- |    |  |   |
|----|--|---|
| b) | Fout in het Rotor-Gene Q MDx-instrument                      | Controleer de onderhoudslogboeken van het instrument.<br>Verkeerde uitlijning van de lens kan bijvoorbeeld leiden tot een hogere achtergrond. Als uitlijning van de lens geen deel uitmaakt van uw onderhoudsplan, neemt u contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN voor meer informatie en potentiële handelingen.  |
| c) | Fout in de accessoires van het Rotor-Gene Q MDx-instrument   | Mogelijk is de rotor met 72 putjes onjuist vergrendeld. Herhaal de PCR-run.   |
| d) | Het reactiemengsel is afgebroken                             | De kit is meer dan vier keer ingevroren/ontdooid, of de inhoud van de kit is niet bij $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ tot $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ bewaard, of het PPM of reactiemengsel waren niet beschermd tegen licht.<br>Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket) van de reagentia en neem een nieuwe kit. Herhaal de PCR-run.         |
| e) | Omkering van stripbuisjes en/of monsteridentificaties        | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Herhaal de PCR-run.   |
| f) | Controles ontbreken of zijn op een verkeerde positie geladen | Controleer of de juiste controle op de juiste positie is geladen.   |
| g) | Slecht mengen van controlemonsters                           | De controles waren vóór het laden niet volledig ontdooid, of het mengen van de controles met het reactiemengsel (op-en-neer pipetteren) werd niet op de juiste manier gedaan. Herhaal de PCR-run.   |
| h) | Onjuist pipetteervolume                                      | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Controleer of een volume van $4\text{ }\mu\text{l}$ van de controle en een volume van $16\text{ }\mu\text{l}$ van het qPCR-reactiemengsel zijn toegevoegd. Inspecteer alle gepipetteerde volumes visueel.<br>Controleer de pipetten en kalibreer deze indien nodig opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt. |
| i) | Inefficiënt afsluiten van het buisje                         | Het buisje werd niet goed afgesloten, leidend tot verdamping tijdens de qPCR-run.   |

### Assay ongeldig vanwege ongeldige geen-template-controle (no-template control, NTC) of negatieve controle (NC)

- |    |   |   |
|----|---|---|
| a) | Kruiscontaminatie of contaminatie van reagentia | Hanteer monsters, kitonderdelen en verbruiksartikelen altijd conform aanbevolen methoden ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven materiaal.<br>Zorg ervoor dat de tips worden vervangen voordat een ander reagens wordt gepipetteerd of wanneer andere buisjes worden geplaatst. Bereid het qPCR-reactiemengsel met speciaal daarvoor bestemde materialen (pipetten, tips, etc.).<br>Bereid het qPCR-reactiemengsel en de NTC-reactie in een speciaal daarvoor bestemde ruimte waar geen DNA-matrijzen (DNA, plasmiden of PCR-producten) kunnen worden geïntroduceerd.<br>Herhaal de PCR-run. |
|----|---|---|

### Opmerkingen en suggesties

- |   |   |
|---|---|
| b) Eén bestanddeel van het reactiemengsel niet toegevoegd | Controleer of het reactiemengsel op de juiste wijze is bereid (Tabel 3 op pagina 38). Controleer of alle bestanddelen van het qPCR-reactiemengsel zijn toegevoegd. Herhaal de PCR-run.  |
| c) Omkering van stripbuisjes en/of monsteridentificaties  | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Herhaal de qPCR-run.  |
| d) Het reactiemengsel of de probes zijn afgebroken        | Bewaar de inhoud van de kit bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C en bescherm het PPM-buisje tegen licht.<br>Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket) van de reagentia en neem een nieuwe kit. Herhaal de PCR-run. |
| e) Incorrecte amplificatiecurve (artefacten)              | Controleer de bijbehorende amplificatie op ongebruikelijke curven (bijv. rechte lijn).<br>Herhaal de qPCR-run.  |

### Ongeldig monster vanwege de waarschuwing "Low input"

- |  |  |
|--|--|
| a) Conditie van het FFPE-blok                            | Controleer de vervoers-/bewaarcondities van het gebruikte FFPE-blok.   |
| b) Bereiding van het FFPE-blok                           | Vergewis u ervan dat het monster werd gefixeerd in 4–10% formaline.<br>Vergewis u ervan dat één tot twee coupes van 5 µm dik werden gesneden om een weefseloppervlakte van 100 mm <sup>2</sup> te kunnen bereiken, zodat er sprake is van voldoende cellen.  |
| c) Mogelijk is het pipetteervolume onjuist               | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Controleer of een volume van 4 µl van het monster en een volume van 16 µl van het qPCR-reactiemengsel zijn toegevoegd. Inspecteer alle gepipeteerde volumes visueel.<br>Controleer de pipetten en kalibreer deze indien nodig opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt.   |
| d) gDNA-zuivering of omzetting met bisulfiet mislukt     | Controleer of de werkstroomcontrole de verwachte resultaten opleverde.<br>Vergewis u ervan dat het werkstroomprotocol van de <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR-kit werd gevolgd, zoals boven beschreven. Vergewis u ervan dat de houdbaarheidsdatum van de kits niet is verstreken en dat de reagentia op de juiste wijze worden bereid (bijv. het toevoegen van ethanol, het vermijden van de overbrenging van precipitaten naar de MinElute DNA-spinkolom).<br>Controleer of tijdens de hantering van de materialen de kamertemperatuur niet lager dan 15 °C is, om kristallisatie van de buffers te vermijden.<br>Controleer de vervoers- en bewaarcondities.<br>Herhaal de gehele werkstroom. |
| e) Omkering van stripbuisjes en/of monsteridentificaties | Controleer het pipetteerschema en of een leeg busje zich op de juiste positie bevindt, en controleer de instellingen van de reactie. Herhaal de PCR-run.   |
| f) Slechte kwaliteit van gDNA-monster                    | Herhaal de run met meer materiaal. Maximaal 1000 ng DNA-invoer, gemeten met gebruikmaking van een OD260 nm-methode, kan worden gebruikt.   |

### Opmerkingen en suggesties

- |   |   |
|---|---|
| g) Inefficiënt afsluiten van het buisje | Het buisje werd niet goed afgesloten, leidend tot verdamping tijdens de qPCR-run. |
| h) Monster niet geladen                 | Zorg ervoor dat het monster in beide putjes wordt geladen.                        |

#### Ongeldig monster vanwege de waarschuwing "Delta PMR high" (delta-PMR hoog)

- |   |   |
|---|---|
| a) Reactiemengsel is afgebroken   | Bewaar de inhoud van de kit bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C en bescherm de reactiemengsels tegen licht.<br>Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket) van de reagentia en neem een nieuwe kit. Herhaal de PCR-run.   |
| b) Mogelijk is het pipetteervolume onjuist  | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Controleer of een volume van 4 µl van de controle/het monster en een volume van 16 µl van het qPCR-reactiemengsel zijn toegevoegd. Inspecteer alle gepipetteerde volumes visueel.<br>Controleer de pipetten en kalibreer deze indien nodig opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt. |
| c) Omkering van stripbuisjes en/of monsteridentificaties                                | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Herhaal de PCR-run.   |
| d) Mogelijk is de amplificatiecurve onjuist   | Controleer de bijbehorende amplificatiecurve op ongebruikelijke curven. Herhaal de run voor het ongeldige monster.  |
| e) Laat signaal vanwege een geringe hoeveelheid, leidend tot variabelere PMR-resultaten | Herhaal de run met meer materiaal. Maximaal 1000 ng DNA-invoer, gemeten met gebruikmaking van een OD260 nm-methode, kan worden gebruikt.  |
| f) Slecht mengen van controlemonsters   | De controle was vóór het laden niet volledig ontdooid, of het mengen van de controle met het reactiemengsel (op-en-neer pipetteren) werd niet op de juiste manier gedaan. Herhaal de PCR-run.   |
| g) Inefficiënt afsluiten van het buisje   | Het buisje werd niet goed afgesloten, leidend tot verdamping tijdens de qPCR-run.   |

#### Ongeldig monster vanwege de waarschuwing "one replicate invalid" (één duplicaat ongeldig)

- |  |  |
|--|--|
| a) Niet genoeg materiaal (tegen de limiet aan) | Herhaal de run met meer materiaal. Maximaal 1000 ng DNA-invoer, gemeten met gebruikmaking van een OD260 nm-methode, kan worden gebruikt. |
|--|--|

### Opmerkingen en suggesties

- |  |  |
|--|--|
| b) Mogelijk is het pipetteervolume onjuist               | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Controleer of een volume van 4 µl van de controle/het monster en een volume van 1 ó µl van het qPCR-reactiemengsel zijn toegevoegd. Inspecteer alle gepipetteerde volumes visueel.<br>Controleer de pipetten en kalibreer deze indien nodig opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt. |
| c) Omkering van stripbuisjes en/of monsteridentificaties | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Herhaal de PCR-run.  |
| d) Mogelijk is de amplificatiecurve onjuist              | Controleer de bijbehorende amplificatiecurve op ongebruikelijke curven.<br>Herhaal de PCR-run.   |
| e) Slecht mengen van controlemonsters                    | De controle was vóór het laden niet volledig ontdooid, of het mengen van de controle met het reactiemengsel (op-en-neer pipetteren) werd niet op de juiste manier gedaan. Herhaal de PCR-run.  |
| f) Inefficiënt afsluiten van het buisje                  | Het buisje werd niet goed afgesloten, leidend tot verdamping tijdens de qPCR-run.  |
| g) Eén van de twee monsterputjes niet geladen            | Zorg ervoor dat het monster in beide putjes wordt geladen.   |

#### Run mislukt door inconsistent fluorescentiesignaal in controles en/of monsters (in alle buisjes)

- |  |   |
|--|---|
| Fout in de accessoires van het Rotor-Gene Q MDx-instrument | Controleer de onderhoudslogboeken van het instrument.<br>Mogelijk is de rotor met 72 putjes defect. |
|--|---|

## Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN wordt elke partij van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit getest ten opzichte van vooraf vastgelegde specificaties om consistente productkwaliteit te garanderen.

De volledige kit is aan een kwaliteitscontrole op een Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument onderworpen. Deze kit is geproduceerd conform de norm ISO 13485. Op aanvraag zijn analysecertificaten verkrijgbaar via [www.qiagen.com/support](http://www.qiagen.com/support).

---

# Beperkingen

De kit is bestemd voor professioneel gebruik. De prestaties van het systeem zijn alleen vastgesteld met gebruikmaking van met formaline gefixeerd en in paraffine ingebed (FFPE) borstkankerweefsel.

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit is alleen gevalideerd voor FFPE-weefsel uit oestrogeenreceptorpositieve, HER2-negatieve, lymfeknooppositieve borstkankerpatiënten met verhoogd risico.

Het product mag alleen worden gebruikt door bevoegde gebruikers, zoals analisten en artsen die zijn opgeleid in moleculair-biologische technieken en in-vitrodiagnostische procedures.

Deze kit dient te worden gebruikt conform de instructies in deze handleiding, in combinatie met gevalideerde instrumenten die worden vermeld in "Benodigde maar niet meegeleverde materialen" op pagina 12.

Alle reagentia in de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit zijn uitsluitend bestemd voor gebruik met de andere reagentia in dezelfde kit.

Let goed op de vervaldatum op het etiket van de doos. Gebruik geen onderdelen waarvan de vervaldatum is verstreken.

De *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit is alleen gevalideerd voor gebruik met Deparaffinization Solution (cat.nr. 19093), of xyleen-ethanol of histolemon-ethanol, de QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit (cat.nr. 60404) en de EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit (cat.nr. 59824 of 59826).

Alleen de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (voor PCR) is gevalideerd.



---

Bij off-label gebruik van dit product en/of modificatie van de onderdelen vervalt de aansprakelijkheid van QIAGEN.

Alle diagnostische resultaten moeten worden gegenereerd in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen.

Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden gebruikt en niet worden gedekt door de prestatieonderzoeken van QIAGEN.

# Prestatiekenmerken

Daar waar biologische monsters werden gebruikt in de onderzoeken in dit gedeelte, werd de deparaffinisatiestap voorafgaand aan gDNA-extractie uitgevoerd met gebruikmaking van Deparaffinization Solution van QIAGEN. Opgemerkt dient echter te worden dat de gelijkwaardigheid van Deparaffinization Solution en xyleen of histolemon is aangetoond.

## Blancolimiet

De blancolimiet (limit of blank, LoB) werd bepaald op basis van het gegevenspunt dat overeenkomt met het onder- en bovenpercentiel van 95% van de resultaten die zijn verkregen met respectievelijk de PMR 0- en PMR 100-monsters, zoals beschreven in CLSI/NCCLS EP17-A2 (14). Geteste monsters komen overeen met kunstmatige monsters die zijn gegenereerd met verschillende kopieaantallen (100, 200, 500 en 750 kopieën) van niet-doelplasmide (doel van de andere probe) in een achtergrond van niet-omgezet gDNA. De LoB-resultaten zijn gebaseerd op 64 en 63 metingen voor de probes die gericht zijn op vroegere gemethyleerde sequenties en 64 en 61 metingen voor de probes die gericht zijn op vroegere niet-gemethyleerde sequenties, per batch, met gebruikmaking van twee verschillende kitpilotbatches. De LoB-resultaten worden samengevat in Tabel 8.

**Tabel 8. Overzicht van de blancolimietresultaten**

	PMR 0-monsters		PMR 100-monsters	
	Gemeten LoB, PMR	Definitieve LoB, PMR	Gemeten LoB, PMR	Definitieve LoB, PMR
Batch 1	0		99	
Batch 2	0	0	98	98

## Detectielimiet

Volgens de Probit-aanpak die wordt beschreven in de CLSI/NCCLS EP17-A2 (14) is de detectielimiet (limit of detection, LoD) de PMR-waarde waarbij 95% van de metingen de LoB overschrijdt. De LoD werd voor iedere probe bepaald bij de minimale gDNA-invoer van 200 ng en bij de aanbevolen gDNA-invoer van 400 ng, met gebruikmaking van twee verschillende pilotbatches van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit. Per geteste invoer (200 ng en 400 ng) en voor iedere probe was er sprake van drie monsters. Deze monsters werden geproduceerd bij verschillende totale amplificeerbare kopie aantallen, d.w.z. 50, 100 en 150 kopieën voor de gDNA-invoer van 200 ng, en 100, 200 en 300 kopieën voor de gDNA-invoer van 400 ng. Daarom werden voor het LoD-onderzoek in totaal 60 monsters geproduceerd. Geteste monsters komen overeen met kunstmatige monsters die geproduceerd zijn op basis van mengsels van doel- en niet-doelplasmiden (daarbij vijf verschillende theoretische PMR-niveaus per monster opleverend) in een achtergrond van niet-omgezet gDNA. Voor iedere geteste probe bij iedere invoer worden de LoD-resultaten verkregen op basis van ten minste 20 metingen per pilotbatch van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit voor ieder PMR-niveau van ieder monster. De LoD voor monsters met een lage PMR bedraagt 4 en de LoD voor monsters met een hoge PMR bedraagt 92 (Tabel 9).

Tabel 9. Overzicht van de detectielimietresultaten

Monster	Invoer (ng)	Batch	LoD-waarde	Onderste limiet	Bovenste limiet
Monster met lage PMR	200	Batch 1	3	3	5
	200	Batch 2	3	3	4
	400	Batch 1	3	2	6
	400	Batch 2	4	3	6
Monster met hoge PMR	200	Batch 1	92	92	92
	200	Batch 2	>92	n.v.t.	n.v.t.
	400	Batch 1	94	93	95
	400	Batch 2	95	93	95

n.v.t.: Niet van toepassing.

---

## DNA-invoer

Er werden vijf verschillende niveaus van gDNA-invoer (50, 100, 200, 400 en 1000 ng) getest, waarvan elk zeven verschillende PMR-niveaus (0, 5, 10, 25, 40, 50 en 75) opleverde. De maximale gDNA-invoer werd om technische redenen gedefinieerd bij 1000 ng, aangezien in een werkelijke situatie een grotere hoeveelheid moeilijk te verkrijgen zou zijn. Het bereik van gDNA-invoerniveaus dat aanvaardbaar is voor de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit werd bepaald door middel van Deming-regressie met gebruikmaking van één pilotbatch van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit en één Rotor-Gene Q MDx-instrument.

Het onderzoek heeft het volgende aangetoond:

- De gDNA-invoer die wordt aanbevolen voor gebruik met de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit bedraagt 400 ng
- De minimaal aanvaardbare gDNA-invoer bedraagt 200 ng en de maximale gDNA-invoer bedraagt 1000 ng.
- De minimale gDNA-invoer dient alleen te worden getest als de aanbevolen invoer niet kan worden bereikt, omdat het risico op het verkrijgen van een ongeldig resultaat als gevolg van een lage invoer wordt verhoogd, leidend tot een grote kans op een hertest. Het testen van de maximale gDNA-invoer wordt aanbevolen wanneer een gDNA-invoer van 400 ng een ongeldig PMR-resultaat oplevert, bijvoorbeeld als gevolg van de waarschuwing "Low input".

## Lineariteit

Het lineariteitsonderzoek werd uitgevoerd overeenkomstig de CLSI/NCCLS EP6-A (15). De lineariteit van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit werd bepaald met zeven monsters bij verschillende niveaus van PMR (0, 5, 10, 25, 40, 50 en 75), bereid op basis van vijf verschillende niveaus van gDNA-invoer (waaronder 200, 400 en 1000 ng). Het onderzoek werd uitgevoerd met gebruikmaking van één pilotbatch van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-

kit op één Rotor-Gene Q MDx-instrument door één operator. Het onderzoek toonde aan dat de lineariteit wordt bevestigd met monsters waarvoor de PMR tussen de 5 en 50 bedraagt, bij de aanvaardbare niveaus van gDNA-invoer (d.w.z. 200–1000 ng).

## Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

De herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit werden bepaald tijdens het verloop van een precisieonderzoek in één centrum en een precisieonderzoek in meerdere centra, beide uitgevoerd overeenkomstig de CLSI/NCCLS EP5-A3 (16), zie Tabel 10 en Tabel 11. De precisieonderzoeken werden uitgevoerd met drie biologische monsters die een zeer lage, lage en hoge PMR (respectievelijk 9, 16 en 77) opleverden. In het precisieonderzoek in één centrum werden de bronnen van variabiliteit vastgesteld op 23 niet opeenvolgende werkdagen door drie operatoren met gebruikmaking van drie verschillende pilotbatches van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit en drie Rotor-Gene Q MDx-instrumenten. Er werden bij iedere run twee metingen per monster verkregen. Per dag werden twee identieke runs uitgevoerd met ten minste twee uur tussen de runs. Gedurende de gehele werkdag is de runtijd variabel geweest, waarbij het tijdsinterval tussen runs ten minste twee uur bedroeg om meer willekeurigheid in het testen aan te brengen. Het precisieonderzoek in meerdere centra werd uitgevoerd bij drie verschillende centra waar één operator één pilotbatch van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit op één Rotor-Gene Q MDx-instrument gebruikte. Er werden bij iedere run vijf metingen per monster verkregen. Bij ieder centrum werd één run per dag uitgevoerd, afwisselend 's ochtends en 's middags.

**Tabel 10. Overzicht van de resultaten van het precisieonderzoek in één centrum**

Monster	Bron van variabiliteit (%)						Totaal
	Binnen de run	Run	Batch	Instrument	Operator	Dag	
Zeer lage PMR	12,29	4,20	0,00	12,54	0,00	9,49	20,39
Lage PMR	19,99	0,00	0,00	3,09	0,00	8,04	21,76
Hoge PMR	3,90	0,00	0,00	0,00	0,00	1,64	4,23

**Tabel 11. Overzicht van de resultaten van het precisieonderzoek in meerdere centra**

Monster	Bron van variabiliteit (%)			
	Tussen runs	Dag	Centrum	Totaal
Zeer lage PMR	13,90	8,43	4,72	16,93
Lage PMR	28,72	0,00	0,00	28,72
Hoge PMR	4,25	0,00	1,77	4,61

## Stoffen met een storende werking

Het Interfering Substances Study (onderzoek naar stoffen met een storende werking) werd uitgevoerd overeenkomstig CLSI/NCCLS EP7-A2 (17). Eerst werd de eindconcentratie geëvalueerd van iedere stof die tijdens de gehele werkstroom van de monsterbereiding werd gebruikt (rekening houdend met het verdunningseffect bij iedere stap). Op basis van de relevantie van de eindconcentratie van iedere stof in het uitgangsmateriaal voor de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit (d.w.z. bisDNA) werden alle mogelijke storende stoffen getest met gebruikmaking van één pilotbatch van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit. De resultaten hebben geen storende invloed laten zien van de stoffen die tijdens de gehele werkstroom van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit worden gebruikt (Tabel 12).

**Tabel 12. Geteste stoffen met een storende werking**

Geteste stof	Getest eindvolume in 30 µl
Deparaffinization Solution	$1,4 \times 10^{-15}$
Histolemon	$2,10 \times 10^{-20}$
Ethanol (96–100%)	0,50
Bisulfite Solution	$7,2 \times 10^{-09}$
DNA Protect Buffer	$2,26 \times 10^{-10}$
Buffer BL	$3,44 \times 10^{-08}$
Buffer BW	0,1102
Buffer BD	0,002

---

## Kruiscontaminatie

De kruiscontaminatie tussen negatieve en positieve monsters werd vastgesteld met gebruikmaking van één pilotbatch van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit en twee Rotor-Gene Q MDx-instrumenten. Er werden zes condities getest met gebruikmaking van NTC en/of Negative Control als negatieve monsters met of zonder een bisDNA-monster, dat een lage PMR als positief monster oplevert. De kruiscontaminatie werd geëvalueerd bij 1,3%.

## Tijdsbestek tijdens gebruik

Het maximale tijdsbestek tussen de voorbereiding van de plaat en de start van de qPCR-run werd bepaald met gebruikmaking van één pilotbatch van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit en één kunstmatig monster dat werd gegenereerd op basis van doel- en niet-doelplasmiden en dat een middelmatige PMR opleverde. Het maximaal aanvaardbare tijdsbestek bedraagt 24 uur; aanbevolen wordt echter om de qPCR-run met de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit zo snel mogelijk na het voorbereiden van de plaat te starten (d.w.z. nadat alle te testen monsters zijn geladen).

## Validatie klinische cut-off

Er werd een prospectieve analyse uitgevoerd om de klinische cut-off van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit te valideren met FFPE-weefsel uit 145 lymfeknooppositieve, oestrogenereceptorpositieve, HER2-negatieve borstkankerpatiënten met verhoogd risico. De monsters die in het onderzoek werden opgenomen bestonden uit gearhiveerd FFPE-weefsel dat voldeed aan de volgende criteria:

- Histologisch bevestigde invasieve borstkanker
- Primaire tumor, stadium pT1, pT2 en pT3
- Histologisch bevestigde betrokkenheid van lymfeknopen ( $\geq N1$ )
- Standaard adjuvante, op anthracycline gebaseerde chemotherapie

- Geen dosisintensieve therapie
- Geen andere primaire systemische chemotherapie (geen bijkomende taxanen), behalve hormonale therapie

Voor ieder monster werd de PMR gemeten met gebruikmaking van het definitieve kitformaat en de instructies in de handleiding.

De ziektevrije overleving (disease-free survival, DFS) was het primaire eindpunt en werd gedefinieerd als de tijd vanaf de primaire chirurgie tot het eerste gedocumenteerde DFS-voorval. De datum van de primaire chirurgie werd beschouwd als de follow-upindexdatum. DFS-voorvallen waren onder meer het terugkomen van kanker (lokaal terugkomen van de ziekte of afgelegen metastase), secundaire maligniteiten die als levensbedreigend werden beschouwd en overlijden door welke oorzaak ook. Voor patiënten die overleden zonder terugkomen van de kanker werd concurrerende risicoanalyse volgens Fine en Gray toegepast (13).

De analyse werd uitgevoerd voor een DFS-follow-up tijd die werd gecontroleerd na 10 jaar. Overlevingscurven werden berekend volgens de incidentiefunctie (13). De vooraf gedefinieerde cut-off-waarde van PMR 12 van PITX2 liet een statistisch significant verschil tussen de twee groepen zien voor het primaire eindpunt DFS, met een significantieniveau  $p < 0,05$  (tweezijdig; alfa-waarde). Daarom is aangetoond dat de methylatietoestand van de PITX2-promotor, vastgesteld met de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kitassay, een voorspellende waarde heeft voor op anthracycline gebaseerde chemotherapie bij lymfeknooppositieve, oestrogenreceptorpositieve, HER2-negatieve borstkankerpatiënten met verhoogd risico.

















# Referenties

1. Basu, M., Roy, S.S. (2013) Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3. *J Biol Chem.* **288**, 4355.
2. Chen, F., Chen F., Yao, H. et al. (2016) Suppressing Pitx2 inhibits proliferation and promotes differentiation of iHepSCs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **80**, 154.
3. Fung, F.K., Chan, D.W., Liu, V.W., Leung, T.H., Cheung, A.N., Ngan, H.Y. (2012) Increased expression of PITX2 transcription factor contributes to ovarian cancer progression. *PLoS One* **7**, e37076.
4. Lee, W-L., Chakraborty, P.K., Thévenod, F. (2013) Pituitary homeobox 2 (PITX2) protects renal cancer cell lines against doxorubicin toxicity by transcriptional activation of the multidrug transporter ABCB1. *Int. J. Cancer* **133**, 556.
5. Xu, J., Prosperi, J.R., Choudhury, N., Olopade, O.I., Goss, K.H. (2015)  $\beta$ -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS One* **10**, e0117097.
6. Lee, W-K., Thévenod, F. (2016) Upregulation of the multidrug resistance P-glycoprotein ABCB1 by transcription factor pituitary homeobox 2 (Pitx2) in human colon and kidney cancers. *FASEB J.* **30** (nr. 1 Supplement), 439.2.
7. Maier, S., Nimmrich, I., Koenig, T. et al. (2007) DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients-Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group. *Eur. J. Cancer* **43**, 1679.
8. Harbeck, N., Nimmrich, I., Hartmann, A. et al. (2008) Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA-methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5036.

9. Hartmann, O., Spyrtos, F., Harbeck, N. et al. (2009) DNA-methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 315.
10. Lesche, R., Martens, J.W.M., Maier, S. et al. (2009) Identification of novel DNA-methylation markers predicting outcome in node-positive, anthracycline-treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **100** (supplement), A6009.
11. Foekens, J., Harbeck, N., König, T. et al. (2011) Prognostic markers for prediction of treatment response and/or survival of breast cell proliferative disorder patients. *Europees octrooi 2011*; EP 1 561 821 B1.
12. Aubele, M., Schmitt, M., Napieralski, R. et al. (2017) The predictive value of PITX2 DNA methylation for high-risk breast cancer therapy: current guidelines, medical needs, and challenges. *Disease Markers*. Artikelidentificatie 4934608.
13. Fine, J.P., Gray, R.J. (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J. Am. Stat. Assoc.* **94**, 496.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: goedgekeurd richtsnoer, 2e ed.* CLSI-document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (voorheen NCCLS).
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2003). *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; goedgekeurd richtsnoer, eerste editie.* CLSI-document EP6-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (voorheen NCCLS).
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014). *Evaluation of Precision of Quantitative Procedures; Goedgekeurd richtsnoer, derde editie.* CLSI-document EP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (voorheen NCCLS).
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). *Interference Testing in Clinical Chemistry: goedgekeurd richtsnoer, 2e ed.* CLSI-document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (voorheen NCCLS).

# Symbolen

De volgende symbolen kunnen op de verpakking en etiketten zijn weergegeven:

Symbol	Definitie van symbool
 $\Sigma$ <N>	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	CE-markering voor Europese regelgeving
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer
	Global Trade Item Number
	Temperatuurbepering
	Revisie van de handleiding waarbij n het revisienummer is
	Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Weghouden van zonlicht
	Voorzichtig

---

## Contactgegevens

Neem voor technische ondersteuning en aanvullende informatie contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**. Ook kunt u bellen naar 00800-22-44-6000 of contact opnemen met een van de afdelingen voor technische services van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# Bestelinformatie

Product	Inhoud	Cat.nr.
<b><i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR-kit – voor de bepaling van de verhouding van het percentage methylatie (PMR) in de PITX2-promotor 2</b>		
<i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR-kit (8)	Voor 8 reacties: PITX2 RGQ PCR Master Mix, PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix, PITX2 RGQ PCR Reference 50, PITX2 RGQ PCR Reference Low, PITX2 RGQ PCR Negative Control en PITX2 RGQ PCR NTC	873211
<b>Rotor-Gene Q MDx-platform, software en accessoires</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-platform	Realtime-PCR-cycler en smeltanalyse met hoge resolutie (HRM) met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software en accessoires, inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en werk; installatie en opleiding niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-systeem	Realtime-PCR-cycler en smeltanalyse met hoge resolutie (HRM) met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software en accessoires, inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en werk, installatie en opleiding	9002033

<b>Product</b>	<b>Inhoud</b>	<b>Cat.nr.</b>
Rotor-Gene AssayManager v2.1	Software voor routinetests in combinatie met de Rotor-Gene Q en Rotor-Gene Q MDx-instrumenten.	9024203
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumblok voor het handmatig opzetten van de reactie met een eenkanaalspipet in 72 buisjes van 0,1 ml	9018901
72-Well Rotor	Voor het vasthouden van stripbuisjes van 0,1 ml met dop; vereist vergrendelingsring voor rotor met 72 putjes	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Voor het vergrendelen van stripbuisjes van 0,1 ml met dop in de rotor met 72 putjes	9018904
Rotor Holder	Losse metalen houder voor het verzamelen van buisjes en Rotor-Discs® in een rotor	9018908
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 1000 reacties	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 10.000 reacties	981106
<b>Verwante producten</b>		
QIAamp DSP DNA FFPE-weefselkit (50)	Voor 50 DNA-bereidingen: 50 QIAamp MinElute-kolommen, proteïnase K, buffers, verzamelbuisjes	60404
Deparaffinization Solution (16 ml)	16 ml Deparaffinization Solution	19093

Product	Inhoud	Cat.nr.
EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit (200)	Voor 200 DNA-omzettingen: Bisulfietoplossing, DNA Protect Buffer, MinElute DNA-spinkolommen, drager-RNA en buffers	59826
EpiTect Fast DNA Bisulfite-kit (50)	Voor 50 DNA-omzettingen: Bisulfietoplossing, DNA Protect Buffer, MinElute DNA-spinkolommen, drager-RNA en buffers	59824

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de betreffende QIAGEN-kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

---

Deze pagina is met opzet leeg gelaten



---

Deze pagina is met opzet leeg gelaten

Dit product is bestemd voor in-vitrodiagnostisch gebruik. Zonder schriftelijke toestemming van QIAGEN mogen QIAGEN-producten niet worden doorverkocht, gemodificeerd voor doorverkoop of gebruikt voor de productie van commerciële producten.

De in dit document gegeven informatie kan zonder kennisgeving worden gewijzigd. QIAGEN aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten in dit document. Dit document is voor zover bekend volledig en accuraat op het moment van publicatie. In geen geval is QIAGEN aansprakelijk voor incidentele schade, speciale schade, meervoudige schade of gevolgschade in verband met, of voortvloeiend uit, het gebruik van dit document.

Voor QIAGEN-producten geldt een garantie voor de vermelde specificaties. De enige verplichting van QIAGEN en het enige recht van herstel van de klant zijn beperkt tot gratis vervanging van de producten in het geval dat de producten niet functioneren zoals is gegarandeerd.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAxpert®, EpiTect®, MinElute®, *therascreen*®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™, NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific Inc.); TaqMan® (Roche Group).

#### **Beperkte licentieovereenkomst voor de handleiding van de *therascreen* PITX2 RGQ PCR-kit**

Door dit product te gebruiken verklaart de koper of gebruiker zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich in het paneel bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van dit paneel te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij het paneel zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd ten behoeve van QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en garandeert evenmin dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat dit paneel en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Dit paneel en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van het paneel gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen en niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met het paneel en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie voor actuele licentievoorwaarden [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Nov-17 HB-2370-001 © 2017 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

---

Bestellen [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technische ondersteuning [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)