

September 2019

# Gebruiksaanwijzing (Handboek) *therascreen*<sup>®</sup> PIK3CA RGGQ PCR Kit



Versie 1

**IVD**

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Voor gebruik in combinatie met Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex  
HRM-instrumenten

Voor gebruik in combinatie met QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE Tissue Kit

Voor gebruik in combinatie met QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating Nucleic  
Acid Kit



**REF**

873111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
Duitsland

R2 **MAT**

1116336NL

Sample to Insight



# Inhoudsopgave

Beoogd gebruik.....	5
Beperkingen van de procedure.....	6
Samenvatting en uitleg van de test.....	8
Uitgangspunt van de procedure.....	10
Mutatiereactiemengsels.....	10
Platform en software.....	15
Meegeleverde materialen.....	16
Inhoud van de kit.....	16
Benodigde maar niet meegeleverde materialen.....	17
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.....	19
Algemene voorzorgsmaatregelen.....	20
Opslag en hantering van reagentia.....	22
Leveringsvoorwaarden.....	22
Bewaarcondities.....	22
Stabiliteit.....	22
Bewaren en hanteren van specimen.....	24
Bewaren van specimen.....	26
Procedure.....	27
DNA-extractie uit FFPE-specimens.....	27
DNA-extractie uit plasmaspecimens.....	29
Detectie van <i>PIK3CA</i> -mutaties.....	30
Een <i>PIK3CA</i> -mutatie-analyserun uitvoeren.....	36

Resultaten .....	50
Analyse.....	50
Waarschuwingsberichten van Rotor-Gene AssayManager v2.1 <i>therascreen</i> PIK3CA-assayprofiel .....	52
Prestatiekenmerken: weefselspecimens .....	56
Analyseprestaties: weefselspecimens .....	56
Blancolimiet (Limit of Blank, LoB): Weefselspecimens .....	56
Detectielimiet (Limit of Detection, LoD): Weefselspecimens .....	57
Uitgangsbereik genomisch DNA: Weefselspecimens .....	58
$\Delta C_T$ -limietwaarden: Weefselspecimens .....	59
Effect van DNA in het uitgangsmateriaal op de $\Delta C_T$ -waarden (lineariteit): Weefselspecimens .....	60
Assayspecificiteit (kruisreactiviteit/specificiteit): Weefselspecimens .....	61
Verstoring: Weefselspecimens.....	62
Uitwisselbaarheid van partijen: weefselspecimens .....	64
Hanteren van specimens: Weefselspecimens .....	64
Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid: Weefselspecimens .....	65
Kruiscontaminatie/analytische carry-over: weefselspecimens .....	68
Nauwkeurigheid: vergelijking met de analytische referentiemethode (weefselspecimens) .....	69
Klinische prestaties: weefselspecimens .....	71
Prestatiekenmerken: plasmaspecimens.....	76
Analyseprestaties: plasmaspecimens.....	76
Blancolimiet (Limit of Blank, LoB): plasmaspecimens.....	76
Detectielimiet (Limit of Detection, LoD): plasmaspecimens .....	77

---

Uitgangsbereik genomisch DNA: plasmaspecimens.....	78
$\Delta C_T$ -limietwaarden: plasmaspecimens .....	79
Effect van DNA in het uitgangsmateriaal op de $\Delta C_T$ -waarden (lineariteit): plasmaspecimens .....	80
Assayspecificiteit (kruisreactiviteit/specificiteit): plasmaspecimens .....	80
Verstoring: plasmaspecimens .....	81
Uitwisselbaarheid van partijen: plasmaspecimens .....	82
Hanteren van specimens: plasmaspecimens.....	82
Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid: plasmaspecimens.....	83
Validatie van bloedafnamebuisjes .....	87
Nauwkeurigheid: vergelijking met de analytische referentiemethode (plasmaspecimens) .....	88
Klinische prestaties: plasmaspecimens.....	89
Gids voor probleemoplossing.....	95
Referenties .....	97
Contactgegevens .....	97
Symbolen .....	98
Bestelgegevens.....	100
Revisiegeschiedenis van document.....	102

# Beoogd gebruik

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is een real-time kwalitatieve PCR-test voor de detectie van 11 mutaties in het fosfatidylinositol 3-kinase katalytische subeenheid alfa (*PIK3CA*) gen (exon 7: C420R; exon 9: E542K, E545A, E545D [alleen 1635G>T], E545G, E545K, Q546E, Q546R; en exon 20: H1047L, H1047R, H1047Y) met gebruik van genomisch DNA (gDNA) dat is geëxtraheerd uit in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borsttumorweefsel (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) of circulerend tumor-DNA (ctDNA) uit plasma afkomstig uit K<sub>2</sub>EDTA-ontstold perifeer volbloed van patiënten met borstkanker.

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is bedoeld voor gebruik als begeleidende diagnostische test, ter ondersteuning van klinici bij de identificatie van patiënten met borstkanker die in aanmerking kunnen komen voor behandeling met PIQRAY® (alpelisib) op basis van een *PIK3CA*-mutatie-gedetecteerd resultaat. Patiënten met een FFPE-weefsel- of plasmaspecimen dat een positief *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-testresultaat oplevert voor de aanwezigheid van een of meer *PIK3CA*-mutaties komen in aanmerking voor behandeling met PIQRAY (alpelisib). Patiënten met een plasmaspecimen dat een negatief resultaat oplevert met gebruik van deze test moeten een vervolgtest krijgen van een FFPE-tumorweefsel-specimen voor de aanwezigheid van *PIK3CA*-mutaties.

FFPE-tumorspecimens worden verwerkt met de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit voor handmatige monsterbereiding. Plasmaspecimens van K<sub>2</sub>EDTA-ontstold perifeer veneus volbloed worden verwerkt met de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit voor handmatige monsterbereiding. Voor beide soorten specimens wordt het Rotor-Gene Q (RGQ) MDx 5plex HRM-instrument gebruikt voor geautomatiseerde amplificatie en detectie.

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is een medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek.

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit dient te worden gebruikt door daartoe opgeleid personeel in een professionele laboratoriumomgeving.

# Beperkingen van de procedure

- Deze gebruiksaanwijzing moet volledig worden gelezen en begrepen voordat de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wordt gebruikt.
- De resultaten van het product moeten worden geïnterpreteerd met inachtneming van alle relevante klinische en laboratoriumbevindingen en mogen niet op zichzelf worden gebruikt voor diagnose.
- Monsters waarbij resultaten worden gerapporteerd als "No Mutation Detected" (Geen mutatie gedetecteerd), kunnen *PIK3CA*-mutaties bevatten die niet door de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit zijn gedetecteerd.
- Analytische en klinische prestatiegegevens met betrekking tot detectie van de volgende *PIK3CA*-mutaties: E545A, E545D, Q546E, Q546R en H1047Y zijn alleen vastgesteld met gebruik van kunstmatige plasmaspecimens (DNA van de cellijn toegevoegd aan plasma), niet met gebruik van klinische specimens uit de beoogde gebruikspopulatie.
- De detectie van mutaties is afhankelijk van de integriteit van het monster en de hoeveelheid amplificeerbaar DNA dat aanwezig is. De testprocedure dient te worden herhaald als analyse van het DNA in het monster aangeeft dat de hoeveelheid en/of kwaliteit ontoereikend is of dat de concentratie te hoog is voor mutatie-analyse.
- De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wordt gebruikt in een PCR-procedure. Zoals bij alle PCR-procedures, kunnen monsters worden gecontamineerd door externe DNA-bronnen in de testomgeving en het DNA bij de positieve controle. Wees voorzichtig om contaminatie van monsters en kitreagentia te voorkomen.
- Als het monster minder bevat dan het percentage mutant-allelen die door de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit kan worden gedetecteerd, levert dit het resultaat "No Mutation Detected" (Geen mutatie gedetecteerd) op.
- Het is niet bekend of de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit kruisreactiviteit vertoont (hetgeen leidt tot het resultaat "No Mutation Detected" (Geen mutatie gedetecteerd)) met extra *PIK3CA*-mutaties naast degene die worden vermeld als biomarkers die door de kit worden gedetecteerd.

- De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is een kwalitatieve test. De test biedt geen kwantitatieve metingen van de mutant-allelfrequentie (MAF) in een monster.
- De impact op de prestaties van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is onbekend als er microbiële contaminatie wordt geïntroduceerd tijdens assayprocedures. Operators moeten opletten dat er tijdens de testprocedures geen microbiële contaminanten worden geïntroduceerd en mogen geen kitonderdelen gebruiken als er bewijs van microbiële groei is waargenomen.
- De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is alleen bestemd voor gebruik met DNA dat is geëxtraheerd uit FFPE-borstkankerweefsel- of plasmaspecimens die zijn bereid uit K<sub>2</sub>EDTA-ontstold perifeer veneus volbloed van borstkankerpatiënten.
- De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is alleen bestemd voor gebruik met de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (voor weefselspecimens) of de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (voor plasmaspecimens).
- De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is alleen bestemd voor gebruik wanneer alle reactiemengsels worden gebruikt.
- Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door personeel dat specifiek is geïnstrueerd en getraind op het gebied van procedures voor in-vitrodiagnostiek en bediening van Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenten.
- Het product is uitsluitend bedoeld voor gebruik op een Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR-cycler. Geen andere thermocycler met real-time optische detectie dient met dit product te worden gebruikt.
- Voor optimale resultaten dienen de aanwijzingen in de *Gebruiksaanwijzing (Handboek) thesareen PIK3CA RGQ PCR Kit* strikt te worden opgevolgd. Verdunning van de reagentia wordt niet aanbevolen en leidt tot slechtere prestaties.
- Dit handboek is bedoeld voor gebruik met Rotor-Gene AssayManager softwareversie 2.1 met geautomatiseerde bepaling van de mutatiestatus.
- Let op de vervaldatum en opslagcondities die op de verpakking en etiketten van alle componenten staan vermeld. Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken of die op de verkeerde manier zijn bewaard.

---

## Samenvatting en uitleg van de test

De fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K)-signaleringsroute reguleert diverse cellfuncties, waaronder celproliferatie, overleving, translationele regulatie van eiwitsynthese, glucosemetabolisme, celmigratie en angiogenese (1). Activerende somatische missense-mutaties van het *PIK3CA* (fosfatidylinositol 3-kinase katalytische subeenheid alfa) gen die de kinase-activiteit van het PI3K $\alpha$ -eiwit verhogen, zijn geïdentificeerd in tumorweefsels en zijn gelinked aan cellulaire transformatie in veel verschillende menselijke kankers (2), waaronder hormoonreceptorpositieve (HR+) borstkanker (3).

Borstkanker is de meest voorkomende, bij vrouwen gediagnosticeerde kanker en de tweede hoofdoorzaak van kankergerelateerd overlijden (4). In 2018 werd geschat dat in de Verenigde Staten 266.120 vrouwen de diagnose borstkanker zouden krijgen (ongeveer 30% van alle kankers bij vrouwen) en dat 40.920 gevallen van overlijden zouden worden vastgelegd (5). In Europa werd voorspeld dat er in 2018 92.700 vrouwen zouden overlijden aan borstkanker (6). Borstkanker bij mannen is zeldzaam, met <1% van borstkankerdiagnoses bij mannelijke patiënten (4). De aanbevelingen voor behandeling zijn voor beide geslachten desalniettemin hetzelfde.

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is een real-time kwalitatieve PCR in-vitro diagnostische test en wordt uitgevoerd op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. De kit maakt gebruik van primers van het allelrefractair mutatiesysteem (Allele Refractory Mutation System, ARMS), hydrolyseprobes en PCR-clamp-technologieën voor detectie van 11 mutaties (Tabel 1) in exon 7, 9 en 20 van het *PIK3CA*-oncogen tegen een achtergrond van wild-type (WT) DNA.



Tabel 1. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-assaydoelen

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

\* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

---

# Uitgangspunt van de procedure

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bestaat uit zes afzonderlijke PCR-amplificatiereactiemengsels:

- Vijf mutatiespecifieke reacties gericht op exon 7, 9 en 20 van het *PIK3CA*-gen
- Eén controlereactie gericht op exon 15

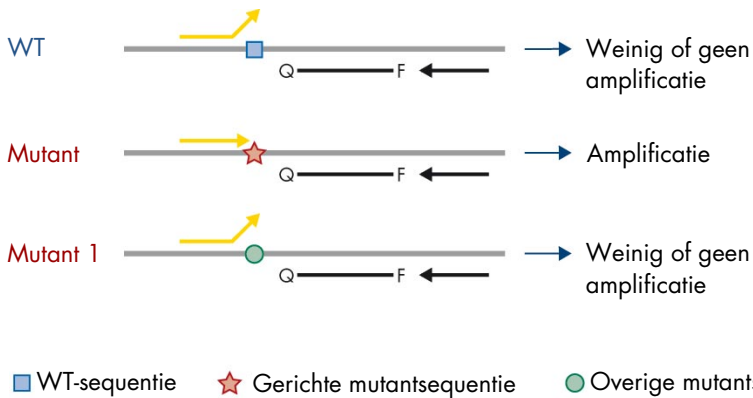
De belangrijkste componenten van de kit worden hieronder besproken.

## Mutatiereactiemengsels

Gemuteerd DNA wordt selectief geamplificeerd en gedetecteerd door mutatiespecifieke reactiemengsels met gebruik van mutatiespecifieke ARMS-primers, probes (hydrolyseprobes en korte, zeer specifieke probes) en PCR-clamps. Mutatiereacties worden gedetecteerd in de kanalen Green, Yellow en Crimson van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.

## ARMS

Allelspecifieke amplificatie wordt uitgevoerd met behulp van ARMS, dat gebruikmaakt van het vermogen van *Taq* DNA-polymerase om onderscheid te maken tussen een overeenstemmende en niet-overeenstemmende base bij het 3'-uiteinde van een PCR-primer. Wanneer de primer volledig overeenkomt, verloopt de amplificatie met optimale efficiëntie. Wanneer de 3'-base niet exact overeenkomt, vindt mogelijk alleen zwakke achtergrondamplificatie plaats. Een gemuteerde sequentie wordt derhalve selectief geamplificeerd, zelfs in monsters waarin de mutatie niet voorkomt op het merendeel van het DNA (Afbeelding 1).

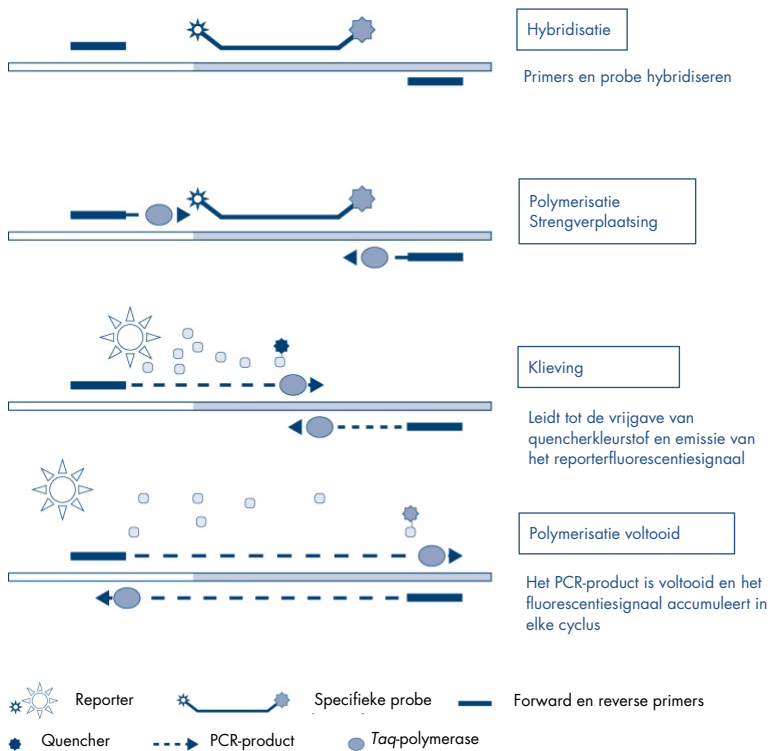


Afbeelding 1. Identificatie van specifieke mutatie door ARMS PCR. WT: Wild-type. Q—F: Probe voor dubbele kleuring. ⇄: Forward en reverse primers.

## Hydrolyseprobes

Hydrolyseprobes hybridiseren in een DNA-regio geamplificeerd door een specifieke set primers. Zodra de *Taq*-polymerase de primer verlengt en de streng in wording synthetiseert, zorgt de 5' tot 3'-exonucleaseactiviteit van de *Taq*-polymerase voor degradatie van de probe, hetgeen leidt tot vrijgave van fluorofoor en fluorescentie-emittantie.

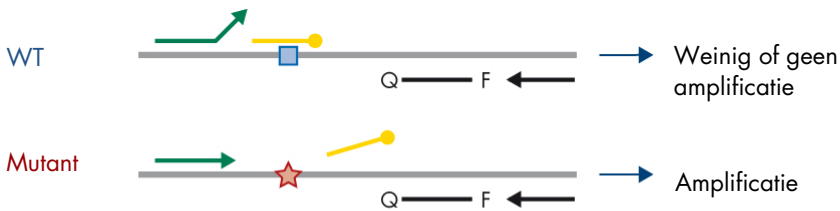
De toename van het fluorescentiesignaal wordt alleen gedetecteerd als de doelsequentie complementair is met de primers en probe, en zodoende wordt geamplificeerd gedurende de PCR (Afbeelding 2).



Afbeelding 2. Reactieprincipe met hydrolyseprobes.

## PCR-clamp

PCR-clamps maken selectieve amplificatie van het mutant-allel mogelijk. PCR-clamps die perfect overeenkomen met wild-type sequentie binden zich aan wild-type template en voorkomen amplificatie door interferentie met primerverlenging. Het 3'-uiteinde van de PCR-clamp wordt geblokkeerd door toevoeging van een fosfaatgroep om verlenging van wild-type sequentie te voorkomen (Afbeelding 3).



- WT-sequentie
- ★ Gerichte mutantsequentie
- 3'-fosfaatoligonucleotide (CLAMP)

Afbeelding 3. PCR-clamp-technologie. WT: Wild-type. Q—F: Probe voor dubbele kleuring. ⇄: Forward en reverse primers.

## Controreactie

Het controreactiemengsel (buisje 1) bevat een forward en reverse primer en gelabelde probe (gedetecteerd in het kanaal Green) voor amplificatie van een korte sequentie van exon 15 van het *PIK3CA*-gen. Aan de hand van de controreactie wordt bepaald of een toereikende hoeveelheid amplificeerbaar DNA aanwezig is in het monster. De controreactie is bovendien een factor bij de analytische berekeningen waarmee de mutatiestatus wordt bepaald.

## Interne controle

Elk reactiemengsel bevat een interne controle om een slechte werking van de reactie te detecteren (bijvoorbeeld als gevolg van de aanwezigheid van remmers). De interne controle maakt gebruik van een niet-*PIK3CA*-gerelateerde oligonucleotide-doelsequentie, ongelabelde forward en reverse primers en een hydrolyseprobe gelabeld met een oranje fluorofoor.

## Positieve controle

De positieve controle (buisje PC) bestaat uit een mengsel van vijf plasmiden die alle 11 mutaties en de controle vertegenwoordigen. Detectie van de mutaties binnen het aanvaardbare bereik bevestigt de juiste werking van elk van de reactiemengsels in de kit.

---

## Negatieve controle

De controle zonder template (buisje NTC, No Template Control) bevat nucleasevrij water voor gebruik bij de NTC-reactie. De NTC dient als negatieve controle en identificeert eventuele contaminatie tijdens het instellen van assays.

## Monsterverdunning

De monsterverdunning (buisje Dil.) bevat nucleasevrij water.

---

# Platform en software

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is specifiek ontworpen voor gebruik met het Rotor-Gene Q MDx-instrument in combinatie met een pc met daarop:

- Rotor-Gene AssayManager® versie 2.1
- Gamma Plug-in versie 1.0.0
- *therascreen*\_PIK3CA\_FFPE Assay Profile versie 1.0.1 voor analyse van weefselspecimens
- *therascreen*\_PIK3CA\_Plasma Assay Profile versie 1.0.1 voor analyse van plasmaspecimens

Raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* voor meer informatie over het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument moet worden onderhouden aan de hand van de vereisten in de gebruiksaanwijzing.

Raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* en de *Gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in* voor meer informatie over de software.

## Runparameters

Het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument is geprogrammeerd voor verschillende cyclusparameters (ook wel 'runs' genoemd) met de *therascreen* PIK3CA-assayprofielen. De assayprofielen bevatten de PCR-runparameters en berekenen de resultaten. De thermische PCR-cyclusparameters voor de assay zijn als volgt:

- Bewaar bij 95 °C gedurende 15 minuten voor activering van de *Taq DNA*-polymerase.
- PCR gedurende 45 cycli bij 95 °C gedurende 30 seconden voor denaturatie, en bij 60 °C gedurende 1 minuut voor hybridiseren en verlengen.

# Meegeleverde materialen

## Inhoud van de kit

<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (24)		
Catalogusnr.		873111
Aantal reacties		24
Inhoud	Dopkleur	Volume
PIK3CA Reaction Mix 1 (PIK3CA-reactiemengsel 1)	Rood	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 2 (PIK3CA-reactiemengsel 2)	Paars	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 3 (PIK3CA-reactiemengsel 3)	Oranje	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 4 (PIK3CA-reactiemengsel 4)	Geel	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 5 (PIK3CA-reactiemengsel 5)	Groen	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 6 (PIK3CA-reactiemengsel 6)	Blauw	750 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase ( <i>Taq</i> ) ( <i>Taq</i> DNA-polymerase ( <i>Taq</i> ))	Mintgroen	85 µl
PIK3CA Positive Control (PC) (PIK3CA positieve controle (PC))	Beige	250 µl
Water for No Template Control (NTC) (Water voor template-loze controle (NTC))	Wit	1,9 ml
Nuclease-free water for Dilution (Dil.) (Nucleasevrij water voor verdunding (Dil.))	Wit	1,9 ml
Gebruiksaanwijzing (Handboek) <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit		1



# Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Verzeker u er voor gebruik van dat de apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

## Reagentia

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, cat.nr. 60404, zie "DNA-extractie uit FFPE-specimens", pagina 27) of QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, cat.nr. 61504, zie "DNA-extractie uit plasmaspecimens", pagina 27)
- DNAZap™ PCR-afbrekende oplossingen
- Distel High Level Laboratory Disinfectant en wasmiddel met isopropylalcohol (IPA)

## Verbruiksartikelen

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, voor gebruik met de 72-Well Rotor (QIAGEN, cat.nr. 981103 of cat.nr. 981106)
- Nucleasevrije, laag DNA-bindende microcentrifugebuisjes voor het bereiden van mastermix
- Nucleasevrije pipettips met aërosolbarrière

## Apparatuur

- Markeerstift
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (cat.nr. 9002032) of Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (cat.nr. 9002033)\*†

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

† Indien van toepassing kan in sommige landen het Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument met een productiedatum vanaf mei 2011 worden gebruikt. De productiedatum kan worden achterhaald via het serienummer op de achterkant van het instrument. Het serienummer heeft de vorm 'mmjinnn', waarbij 'mm' staat voor de cijfers van de productiemaand, 'ij' voor de laatste twee cijfers van het productiejaar en 'nnn' voor de unieke identificatiecode van het instrument.

- Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in en assayprofiel "therascreen\_PIK3CA\_FFPE" en/of "therascreen\_PIK3CA\_Plasma"
- Pipetten\* (instelbaar) specifiek voor monsterbereiding
- Pipetten\* (instelbaar) specifiek voor bereiding van de PCR-mastermix
- Pipetten\* (instelbaar) specifiek voor het toevoegen van template-DNA
- Tafelcentrifuge\* met rotor voor buisjes van 1,5 ml
- Thermomixer\*, schudapparaat met verwarming\*, verwarmingsblok\* of waterbad\* met mogelijkheden voor incubatie bij 56 °C, 70 °C en 90 °C
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (cat.nr. 19413)
- QIAvac Connecting System (cat.nr. 19419)
- Vacuum Pump (cat.nr. 84010) of vergelijkbare pomp die een vacuüm kan produceren van –800 tot –900 mbar
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminium blok voor handmatige reactieopstelling (QIAGEN, cat.nr. 9018901)
- Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes, aluminium blok voor handmatig opzetten van de reactie met een single-channel pipet in 96 x 0,2 ml PCR-buisjes (QIAGEN, cat.nr. 9018905)
- 72-Well Rotor, voor het vasthouden van Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, met reactievolumes van 10–50 µl; vereist Locking Ring 72-Well Rotor (QIAGEN, cat.nr. 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor, voor het vergrendelen van Strip Tubes and Caps, 0.1 ml in de 72-Well Rotor (QIAGEN, cat.nr. 9018904)

---

# Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik.

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit dient te worden gebruikt door daartoe opgeleid personeel in een professionele laboratoriumomgeving.

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Hier kunt u de VIB van alle kits en kitcomponenten van QIAGEN vinden, bekijken en afdrukken.

Alleen voor gebruik in combinatie met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument

Raadpleeg voor veiligheidsinformatie over het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument de gebruikershandleiding bij het instrument.

Alleen weefselspecimens: Alleen voor gebruik met QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Raadpleeg voor veiligheidsinformatie over de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (cat.nr. 60404) het *Handboek van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.

Alleen plasmaspecimens: Alleen voor gebruik met QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit.

Raadpleeg voor veiligheidsinformatie over de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (cat.nr. 61504) het *Handboek van de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit*.

---

## Algemene voorzorgsmaatregelen

- De test is bedoeld voor gebruik met FFPE-borstkankerweefsel-specimens of K<sub>2</sub>EDTA-plasmaspecimens van borstkankerpatiënten.
- Alle chemische en biologische materialen zijn mogelijk gevaarlijk. FFPE-specimenmateriaal en nucleïnezuren die hieruit worden bereid, leveren zeer waarschijnlijk geen infectiegevaar op, maar alle plasmaspecimens moeten worden gehanteerd als mogelijk gevaarlijk. De plaatselijke procedures voor institutionele gezondheid en veiligheid moeten altijd in acht worden genomen.
- Gooi afval van het specimen, monster en de assay weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.
- De reagentia voor de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit zijn optimaal verdund. Verdun reagentia niet nog verder, want dit kan leiden tot verminderde prestaties. Gebruik geen reactievolumes (reactiemengsel plus monster) van onder de 25 µl.
- Alle reagentia die worden geleverd in de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit zijn uitsluitend bedoeld voor gebruik met de andere reagentia in dezelfde *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Vervang de reagentia in de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit niet en gebruik ze niet voor andere *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kits, aangezien dit de prestaties kan verminderen.
- Gebruik alleen de *Taq* DNA-polymerase (buisje *Taq*) in de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Vervang deze niet door *Taq* DNA-polymerase uit andere kits van QIAGEN of door *Taq* DNA-polymerase van een andere leverancier.
- Raadpleeg de gebruikershandleiding van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument voor aanvullende waarschuwingen, voorzorgsmaatregelen en procedures.
- Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken of die op de verkeerde manier zijn bewaard.
- Wees uiterst voorzichtig om contaminatie van de reagentia van de controle- en reactiemengsels met de synthetische materialen die zich in het positieve-controlereagens bevinden te voorkomen.

- 
- Werk uiterst zorgvuldig om kruisbesmetting tussen monsters te voorkomen. Sluit de buisjes meteen af nadat u de monsters hebt toegevoegd.
  - Ontsmet het laadblok zorgvuldig voordat u dit gebruikt voor het bereiden van de mastermixen voor de assay. Het gebruik van DNAZap PCR-afbrekende oplossingen gevolgd door Distel High Level Laboratory Disinfectant en wasmiddel met IPA wordt aanbevolen. Het laadblok moet droog zijn voordat dit wordt gebruikt.
  - Gebruik afzonderlijke, speciale pipetten om reactiemengsels te maken en positieve-controlereagentia toe te voegen.
  - Het bereiden en pipetteren van reactiemengsels voert u uit in een ruimte die gescheiden is van de ruimte waarin de positieve controle wordt toegevoegd.
  - Fluorescent gelabelde moleculen die aanwezig zijn in de reactiemengselreagentia zijn gevoelig voor licht. Bescherm de reagentia in de controle- en reactiemengsels tegen licht om fotobleken te vermijden.
  - Open het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument niet voordat de run is voltooid.
  - Open Rotor-Gene Q-buisjes niet nadat de run is voltooid.
  - Let goed op dat de monsters op de juiste manier worden getest om verkeerde plaatsing van monsters, laadfouten en pipetteerfouten te voorkomen.

---

# Opslag en hantering van reagentia

## Leveringsvoorwaarden

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wordt op droogijs verzonden en moet bij aankomst nog steeds bevroren zijn. Als een onderdeel van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bij aankomst niet bevroren is, als de buitenverpakking tijdens het vervoer open is geraakt of als de verzending geen pakbon, gebruiksaanwijzing 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* PIK3CA RGQ PCR Kit moet direct na ontvangst worden opgeslagen bij een temperatuur van  $-30$  tot  $-15$  °C in een vriezer met een constante temperatuur. Ook moet de kit worden beschermd tegen licht.

Als de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wordt bewaard onder de gespecificeerde bewaarcondities, is de kit stabiel tot de vermelde vervaldatum.

## Stabiliteit

Eenmaal geopend kunnen reagentia in de originele verpakking worden bewaard bij een temperatuur van  $-30$  tot  $-15$  °C gedurende 12 maanden of tot de vervaldatum die staat vermeld op de verpakking. Vermijd herhaald ontdooien en invriezen. Houd een maximum van vijf cycli van invriezen en ontdooien aan.

De reagentia moeten bij kamertemperatuur worden ontdooid gedurende minimaal 1 uur (en maximaal 4,5 uur) voor gebruik. Zodra de reagentia gereed zijn voor gebruik, kunnen de PCR-reacties worden opgezet. De Rotor-Gene Q-buisjes met de mastermixen en het

---

DNA-monster moeten onmiddellijk in de Rotor-Gene Q MDx worden geladen. De totale duur vanaf de start van de PCR-opzet tot de start van de run mag niet meer bedragen dan 7,5 uur als dit wordt gedaan bij kamertemperatuur.

Opmerking: Deze duur omvat zowel de PCR-opzet als de opslag.

Opmerking: Fluorescent gelabelde moleculen die aanwezig zijn in de reactiemengselreagentia zijn gevoelig voor licht. Bescherm de reagentia in de controle- en reactiemengsels tegen licht om fotobleken te vermijden.

Reagentia in de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit zijn optimaal verdund en ze hoeven niet verder te worden gezuiverd of behandeld voorafgaand aan het gebruik.

Let op de vervaldatum en bewaarcondities die op de verpakking en etiketten van alle componenten staan vermeld. Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken of die op de verkeerde manier zijn bewaard.


# Bewaren en hanteren van specimens

## Hanteren van specimens: weefsel

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is bedoeld voor gebruik met gDNA dat is geëxtraheerd uit gereceerde FFPE-tumorweefselspecimens en specimens van dikkenaaldiopsie (Core Needle Biopsy, CNB) van borstkankerpatiënten. Tumoren zijn heterogeen wat betreft zowel genotype als fenotype. Mutatiepositieve tumoren kunnen wild-type DNA bevatten en op dezelfde manier kan histologie duiden op gebieden van niet-tumorweefsel.

### Preparatie van weefselspecimens voor DNA-extractie:

- Gebruik standaardmaterialen en -methoden voor het fixeren van het weefselspecimen in 10% neutraal gebufferde formaline (Neutral Buffered Formalin, NBF) en het inbedden van het weefselspecimen in paraffine. Snij met behulp van een microtoom seriecoupes van 5 µm van het paraffineblok en plaats deze op objectglasjes.
- Laat een daartoe opgeleide persoon (bijvoorbeeld een patholoog) een met hematoxilyne en eosine (H&E) gekleurde coupe beoordelen op tumorgehalte en effectief tumorgebied (Effective Tumor Area, ETA). Markeer het gekleurde objectglasje om het interessegebied (Region of Interest, ROI) te bepalen. Gebruik seriecoupes voor DNA-extractie.  
Opmerking: De gekleurde coupes moeten niet worden gebruikt voor DNA-extractie.
- Schraap overtollige paraffine met behulp van een nieuw, steriel scalpel van het weefsel weg en gooi dit weg.

<p>LET OP</p> 	<p>Gebruik droge scalpels. Voer deze stap niet uit in een laminaire luchtstroomkast of zuurkast.</p>
---	--

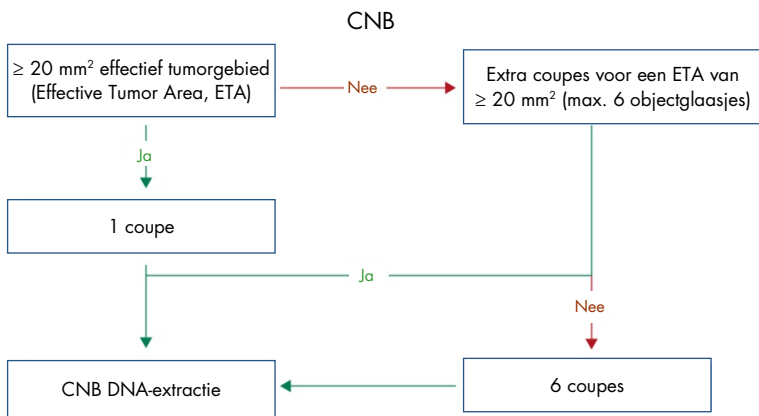
- Schraap het tumorweefsel van de objectglasjes in gemerkte microcentrifugebuisjes. Gebruik voor elk specimen een nieuw scalpel.

Etiket, hanteer en bewaar tumorspecimens, blokken, objectglasjes, monsters en microcentrifugebuisjes die klaar zijn voor extractie op een gecontroleerde wijze conform lokale procedures.

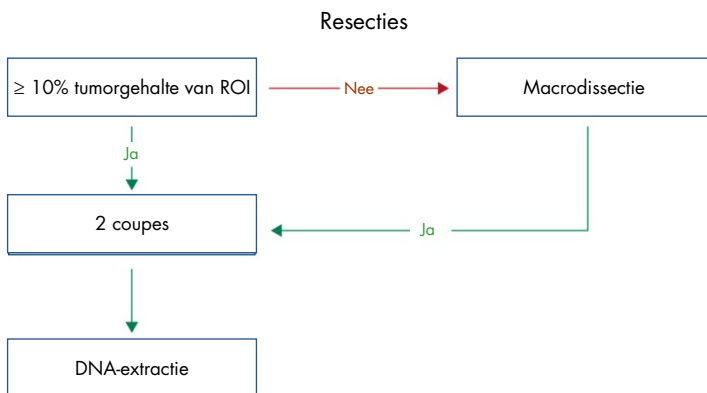


Er bestaan twee afzonderlijke workflows bij gebruik van geresecteerde FFPE-tumorweefsel-specimens en specimens en FFPE-CNB-specimens (Afbeelding 4).

A



B



Afbeelding 4. Zuiveringsworkflow van klinische specimens voor gebruik met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.  
A: FFPE CNB. B: Geresecteerde FFPE-tumorweefsel-specimens.

## Hanteren van specimens: Plasma

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is bedoeld voor gebruik met DNA dat is geïsoleerd uit K<sub>2</sub>EDTA-ontstolde plasmaspecimens van borstkankerpatiënten. Alle plasmaspecimens moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk.

Perifeer veneus volbloed in K<sub>2</sub>EDTA-bloedafnamebuisjes moet binnen vier uur na bloedafname worden verwerkt om plasma te verkrijgen. Als dit niet gebeurt, kan dit leiden tot contaminatie van het genomische DNA in het monster. Voor meer informatie over het isoleren van plasma uit volbloed raadpleegt u bijlage A van het *Handboek van de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit*.

Plasmaspecimens moeten worden bewaard bij –80 °C. Alle bevroren plasmaspecimens moeten voorafgaand aan gebruik op kamertemperatuur worden gebracht.

Etiketeer, hanteer en bewaar specimens, monsters en microcentrifugebuisjes die klaar zijn voor extractie op een gecontroleerde wijze conform lokale procedures.

## Bewaren van specimens

Voorafgaand aan DNA-extractie moeten FFPE-blokken en objectglasjes worden bewaard bij kamertemperatuur (15–25 °C) en moet plasma worden bewaard bij –80 °C. DNA kan na extractie en voorafgaand aan het testen worden bewaard. In Tabel 2 en Tabel 3 vindt u aanwijzingen voor de maximaal aanbevolen bewaartijden en bewaarcondities voor specimens en DNA na extractie.

Tabel 2. Aanbevolen bewaartijden voor gDNA geëxtraheerd uit FFPE-weefsel

Bewaren	Maximaal aanbevolen bewaartijd
Vriezer (–30 tot –15 °C)	5 weken
Koelkast (2–8 °C)	1 week
Vriezer (–80 °C)	33 maanden

Tabel 3. Aanbevolen bewaarcondities en -tijden voor plasma en ctDNA geëxtraheerd uit plasma

Specimen	Bewaren	Maximaal aanbevolen bewaartijd
Plasma	Vriezer (-80 °C)	11 maanden
Geëxtraheerd ctDNA	Vriezer (-30 tot -15 °C)	4 weken

## Procedure

### DNA-extractie uit FFPE-specimens

DNA moet worden geëxtraheerd met behulp van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (cat.nr. 60404).

Opmerking: De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is ontwikkeld met gebruik van DNA dat is geëxtraheerd met behulp van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Gebruik geen ander DNA-extractieproduct.

Voer de DNA-extractie uit volgens de instructies in het *Handboek van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* en let daarbij op het volgende:

- Gebruik het aantal objectglasjes en de elutievolume's zoals aanbevolen in onderstaande paragrafen ("Specimens van FFPE-weefselresectie (RES)" en "FFPE-CNB-specimens" op pagina 28 van dit handboek).
- Voer een extra centrifugatie uit als het weefsel na de eerste centrifugatie niet is gepelleterd.
- Zorg ervoor dat bij alle benodigde stappen ethanol geschikt voor moleculaire biologie\* wordt gebruikt.
- Na het verwijderen van ethanol incubeer u het open buisje bij 15–40 °C gedurende 10 minuten om eventueel achtergebleven ethanol te laten verdampen.

\* Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien daarin andere stoffen aanwezig zijn zoals methanol of methylethylketon.

## Specimens van FFPE-weefselresectie (RES)

- Als RES-specimens beschikken over een  $\geq 10\%$  tumorgehalte in het interessegebied (Region Of Interest, ROI), schraapt u het volledige weefselgebied uit twee coupes (4–5  $\mu\text{m}$ ) in gelabelde microcentrifugebuisjes. Gebruik voor elk specimen een nieuw scalpel. Als specimens beschikken over een  $< 10\%$  tumorgehalte in het ROI, voert u macrodissectie uit en schraapt u alleen het tumor-ROI uit twee coupes in gelabelde microcentrifugebuisjes. Gebruik voor elk specimen een nieuw scalpel.
- De digestie van proteïnase K moet gedurende 1 uur worden uitgevoerd voor geresecteerde weefsel-specimens.
- Voor RES-specimens moet gezuiverd gDNA worden geëluëerd in 120  $\mu\text{l}$  Buffer ATE (meegeleverd in de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit) na 10 minuten incubatie in de kolom.

## FFPE-CNB-specimens

- Gebruik voor CNB-specimens een passend aantal coupes van 4–5  $\mu\text{m}$  om het minimaal vereiste effectieve tumorgebied (Effective Tumor Area, ETA) van 20  $\text{mm}^2$  te verkrijgen uit maximaal zes coupes. Gebruik zo weinig mogelijk coupes (1–6) om een ETA van 20  $\text{mm}^2$  te bewerkstelligen.
- Voor specimens waarbij 20  $\text{mm}^2$  ETA niet haalbaar is met het maximum van zes coupes, gaat u met deze zes coupes verder met de test.
- De digestie van proteïnase K moet gedurende 1 uur worden uitgevoerd voor CNB-specimens.
- Voor CNB-specimens moet gezuiverd genomisch DNA worden geëluëerd in 70  $\mu\text{l}$  Buffer ATE (meegeleverd in de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit), na 10 minuten incubatie in de kolom.

---

## DNA-extractie uit plasmaspecimens

DNA moet worden geëxtraheerd met behulp van de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (cat.nr. 61504) aan de hand van de hieronder beschreven voorwaarden voor zuivering van ctDNA uit plasmaspecimens.

Opmerking: De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is ontwikkeld met gebruik van DNA dat is geëxtraheerd met behulp van de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit. Gebruik geen ander DNA-extractieproduct.

Voer de DNA-extractie uit volgens de instructies voor het "Classic-protocol" in het *Handboek van de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit* en let daarbij op het volgende:

- Het startvolume van plasma is 2 ml.
- Als er niet 2 ml beschikbaar is, past u het volume met PBS-buffer (Phosphate Buffered Saline) aan tot 2 ml.
- Alle centrifugatiestappen moeten worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (15–25 °C).
- Schakel het vacuüm tussen de stappen uit om te garanderen dat er tijdens de protocolstappen een consistent, gelijkmatig vacuüm wordt toegepast.
- Het volume proteïnase K moet 250 µl zijn.
- Elueer het gezuiverde DNA in 70 µl buffer AVE (meegeleverd in de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit).
- De QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit mag alleen handmatig worden gebruikt.
- Zorg ervoor dat bij alle benodigde stappen ethanol geschikt voor moleculaire biologie\* wordt gebruikt
- Bewaar gezuiverd ctDNA bij –30 tot –15 °C.

\* Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien daarin andere stoffen aanwezig zijn zoals methanol of methylethylketon.

Opmerking: Bij alle assays in de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit worden korte PCR-producten gegenereerd. De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit werkt echter niet als het DNA in het uitgangsmateriaal ernstig gefragmenteerd is. Het geëxtraheerde DNA moet binnen het werkbereik van  $C_T$ -controlewaarden ( $\geq 24,68$  en  $\leq 31,68$ ) vallen om een geldig monster te produceren.

## Detectie van *PIK3CA*-mutaties

Dit protocol wordt gebruikt voor de detectie van *PIK3CA*-mutaties.

### Wat u moet weten voordat u begint

- Met het beschikbare PIK3CA-reactiemengsel in elke kit kunnen maximaal 24 monsters in vier runs worden beoordeeld. Gebruik van vier runs is optimaal, waarbij elke run maximaal zes monsters omvat. Bij kleinere monstergroepen kunnen er minder monsters worden getest met elke *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.
- Het monster moet worden getest met alle reactiemengsels die in de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit worden geleverd.
- Het is niet mogelijk om gemengde groepen monsters afgeleid van zowel weefsel- als plasmaspecimens in dezelfde PCR-run te analyseren. PCR-batches moeten volledig bestaan uit ofwel weefselmonsters of plasmamonsters.
- De *Taq* DNA-polymerase (buisje *Taq*) of mengsels met *Taq* DNA-polymerase mogen niet worden gevortexd, aangezien vortexen kan leiden tot inactivatie van het enzym.
- Plaats bij het pipetteren van *Taq* DNA-polymerase de pipetpunt voorzichtig net onder het vloeistofoppervlak zodat er zo weinig mogelijk enzym aan de buitenkant van de punt blijft zitten.

### Wat u moet doen voordat u begint

- Zorg ervoor dat de runs worden uitgevoerd met behulp van de Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in en het assayprofiel "therascreen\_PIK3CA\_FFPE"

(weefsel-specimens) of het assayprofiel "therascreen\_PIK3CA\_Plasma" (plasma-specimens). Zorg ervoor dat de relevante software is geïnstalleerd voordat u het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument voor het eerst gebruikt en volg de instructies voor het starten van een run en de gegevensanalyse ("Een PIK3CA-mutatie-analyserun uitvoeren" op pagina 36).

- Voor elk gebruik moeten alle reagentia, waaronder *Taq* DNA-polymerase (buisje *Taq*), en DNA-monsters ten minste 1 uur (en ten hoogste 4,5 uur) bij kamertemperatuur (15–25 °C) worden ontdooid, 10 keer worden omgedraaid om ze goed te mengen en kort worden gecentrifugeerd om de inhoud onder in het buisje te verzamelen.
- Zorg ervoor dat het PCR-laadblok op de juiste wijze is gedecontamineerd (zie "Algemene voorzorgsmaatregelen", pagina 20) en gedroogd.

## Procedure

1. Ontdooi alle reactiemengsels, water voor de controle zonder template Control, *Taq* DNA-polymerase, PIK3CA-positieve controle en DNA-monsters bij kamertemperatuur (15–25 °C) gedurende ten minste 1 uur en ten hoogste 4,5 uur.
2. Meng alle reagentia na 1 uur zorgvuldig door elk buisje 10 keer om te keren, zodat plaatselijke zoutconcentraties worden vermeden. Centrifugeer alle reagentia kort zodat alle inhoud zich onder in het buisje bevindt.

Opmerking: De *Taq* DNA-polymerase (buisje *Taq*) of mengsels met *Taq* DNA-polymerase mogen niet worden gevortexd, aangezien vortexen kan leiden tot inactivatie van het enzym.

3. Label zes microcentrifugebuisjes (niet meegeleverd) conform Tabel 4. Bereid voldoende mastermixen (controle- en mutatiereactiemengsels) plus *Taq* DNA-polymerase voor de DNA-monsters, één PIK3CA-positieve controlereactie en één controlereactie zonder template, volgens de volumes in Tabel 4.

De mastermixen bevatten alle bestanddelen die nodig zijn voor PCR, behalve het monster.

Opmerking: Bij het bereiden van de mastermix wordt eerst het benodigde volume controle- of mutatiereactiemengsel toegevoegd aan het betreffende buisje en wordt vervolgens de *Taq* DNA-polymerase toegevoegd.

Tabel 4. Bereiding van de mastermixen voor de assay

Buisje met reactiemengsel	Volume reactiemengsel ( $n^* + 3$ )	Volume <i>Taq</i> DNA-polymerase ( $n^* + 3$ )
Buisje RM 1	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Buisje RM 2	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Buisje RM 3	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Buisje RM 4	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Buisje RM 5	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Buisje RM 6	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$

\*  $n$  = aantal DNA-monsters. De waarde  $n$  mag niet hoger zijn dan zes, aangezien er maximaal zes monsters in een run passen. Er zijn drie extra reacties opgenomen zodat er voldoende is om de PCR op te zetten en voor de controles.

4. Doe het dopje op het buisje voor de mastermix en draai het buisje 10 keer om, om de mastermix goed te mengen. Centrifugeer het buisje kort zodat het mengsel zich onder in het buisje bevindt.
5. Zodra de mastermixen gereed zijn, plaatst u onmiddellijk het juiste aantal PCR 4-buisjesstrips (elke strip heeft vier buisjes; PCR 4-buisjesstrips worden niet meegeleverd) in het laadblok volgens het schema in Tabel 4. Doe de dop niet op de stripbuisjes. Voeg meteen 20  $\mu\text{l}$  van de benodigde mastermix toe in elk PCR-stripbuisje.  
Opmerking: Laat de dopjes in de plastic container tot ze nodig zijn.  
Opmerking: Zie Tabel 4 voor de indeling van de buisjes bij het opzetten van de reactiemengsels.



Tabel 5. Runlay-out in het laadblok voor detectie van *PIK3CA*-mutaties

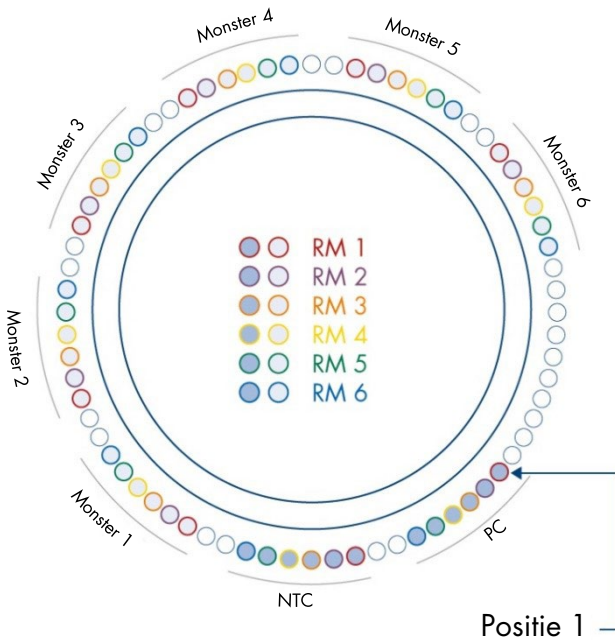
Assay	Controles		Monsternummer						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Buisje RM 1	1	9	17	25	33	41	49	57	E
Buisje RM 2	2	10	18	26	34	42	50	58	E
Buisje RM 3	3	11	19	27	35	43	51	59	E
Buisje RM 4	4	12	20	28	36	44	52	60	E
Buisje RM 5	5	13	21	29	37	45	53	61	E
Buisje RM 6	6	14	22	30	38	46	54	62	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
E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

Opmerking: Elk buisje moet een totaal reactievolume bevatten van 25  $\mu$ l (20  $\mu$ l mastermix volgens Tabel 4, plus 5  $\mu$ l NTC/monster/PC). De plek in het laadblok en de uiteindelijke plek in de rotor worden aangegeven met een getal. E: Leeg.

6. Doe meteen 5  $\mu$ l water voor de controle zonder template bij de NTC-buisjes (buisposities 9-14) en doe de dopjes erop.
7. Voeg 5  $\mu$ l van elk DNA-monster toe in de monsterbuisjes en doe de dopjes erop onmiddellijk na het toevoegen van elk monster om kruiscontaminatie tussen monsters te voorkomen.
8. Doe 5  $\mu$ l PIK3CA-positieve controle bij de PC-buisjes (buispositie 1-6) en doe de dopjes erop.
9. Markeer met een markeerstift de dopjes van de eerste buisjes met de laagste nummers in iedere PCR 4-buisjesstrip (bijvoorbeeld positie 1, 5 en 9 enzovoort) om aan te geven in welke oriëntatie de buisjes in de 72-Well Rotor van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument moeten worden geplaatst.
10. Plaats alle PCR 4-stripbuisjes op de juiste posities in de 72-Well Rotor, zoals aangegeven in het schema (Tabel 5 en Afbeelding 5). Let extra goed op of de buisjes worden overgebracht naar de juiste posities in de 72-Well Rotor (buispositie in 72-Well Rotor moet gelijk zijn aan de buispositie in het laadblok).

Opmerking: Zet een leeg buisje met dop in elke ongebruikte plek. Op deze manier blijft de thermische efficiëntie van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument behouden.

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



Afbeelding 5. Instelling van de plaat en rotor voor een proef met de *therascreen* PIK3CA RQPCR Kit. PC: Positieve controle. S: DNA-monster. NTC: Controle zonder template (water).


LET OP

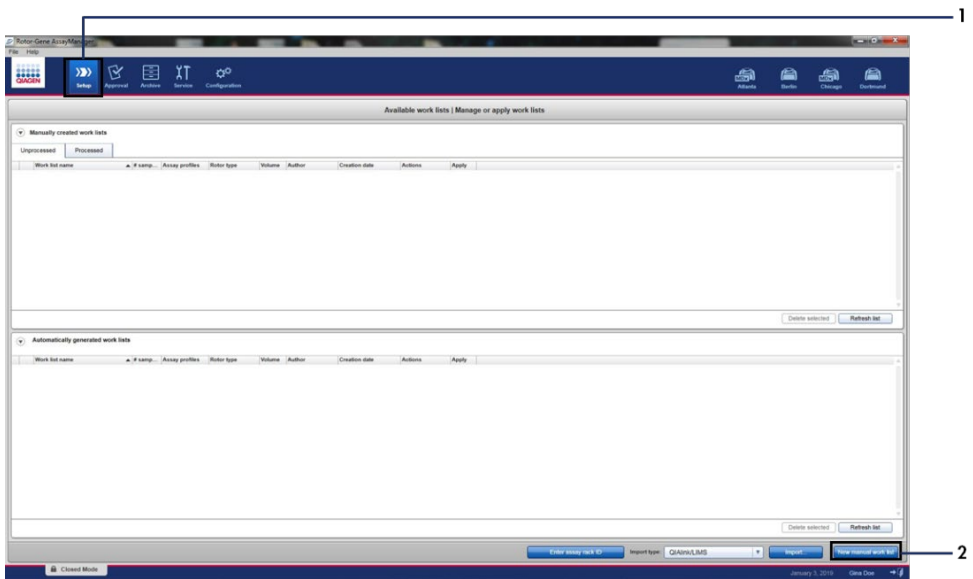


Plaats de buisjes in de rotor op de manier die wordt aangeduid in Afbeelding 5. De geautomatiseerde analyse die in het assayprofiel is ingesteld is namelijk gebaseerd op deze ordening. Als een andere indeling wordt gebruikt, zullen afwijkende resultaten het gevolg zijn.

11. Plaats de 72-Well Rotor meteen in het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Zorg ervoor dat de vergrendelingsring (meegeleverd bij het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument) op de rotor is geplaatst zodat de buisjes gedurende de run op hun plaats worden gehouden en de deksel van het instrument gesloten is.
12. Start de run door de instructies in de volgende paragraaf, "Een PIK3CA-mutatie-analyserun uitvoeren", op te volgen.


## Een *PIK3CA*-mutatie-analyserun uitvoeren

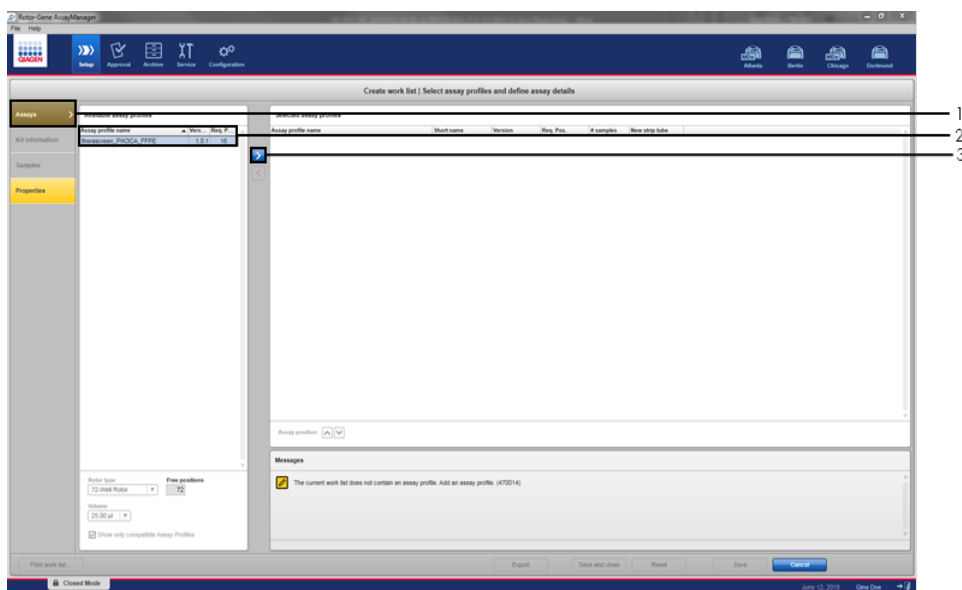
13. Dubbelklik op het Rotor-Gene AssayManager v2.1 pictogram  op het bureaublad van de laptop die is aangesloten op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.
14. Standaard verschijnt de omgeving "Setup" (Instelling). Klik op New manual worklist (Nieuwe handmatige werklíst) om een nieuwe werklíst aan te maken (Afbeelding 6).



Afbeelding 6. Nieuwe handmatige werklíst instellen. 1 = tabblad "Setup" (Instelling), 2 = "New manual work list" (Nieuwe handmatige werklíst).

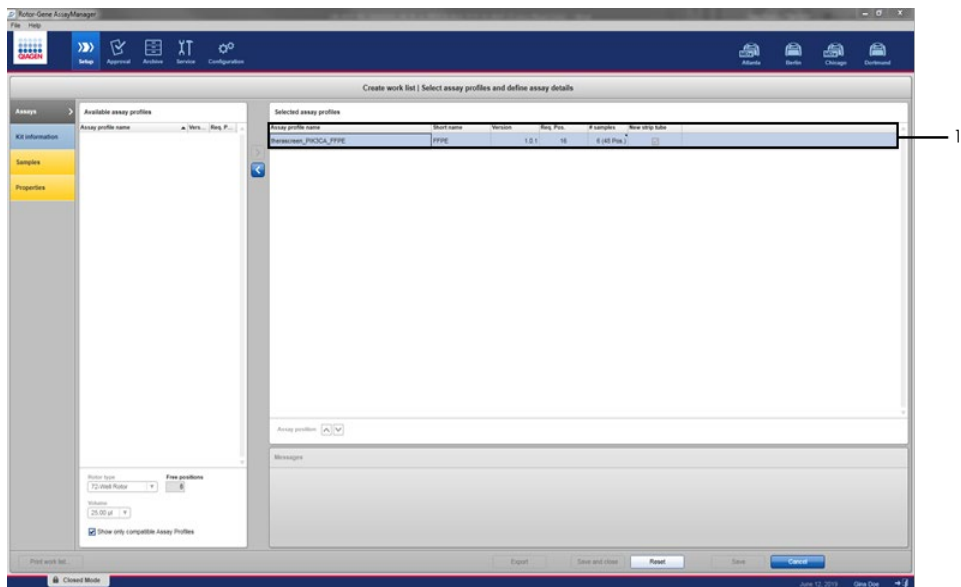
15. Selecteer het tabblad "Assays" aan de linkerkant van het hoofdvenster. Afhankelijk van het monstertype klikt u op het assayprofiel therascreen\_PIK3CA\_FFPE voor weefselmonsters of op het assayprofiel therascreen\_PIK3CA\_Plasma voor plasmamonsters in de lijst met beschikbare assayprofielen en klikt u op de blauwe pijl om het assayprofiel te selecteren. Als de naam van het assayprofiel is ingekort, wijs het assayprofiel dan aan om de volledige naam te bekijken (Afbeelding 7).

 <p>LET OP</p>	<p>Controleer of het juiste assayprofiel voor het specimientype is geselecteerd.</p>
---	--



Afbeelding 7. Nieuwe handmatige werklIJst instellen: Assayprofielnaam kiezen. 1 = Tabblad "Assays", 2 = Beschikbare assayprofielen met "therascreen\_PIK3CA\_FFPE" of "therascreen\_PIK3CA\_Plasma" geselecteerd, 3 = Het assayprofiel selecteren.

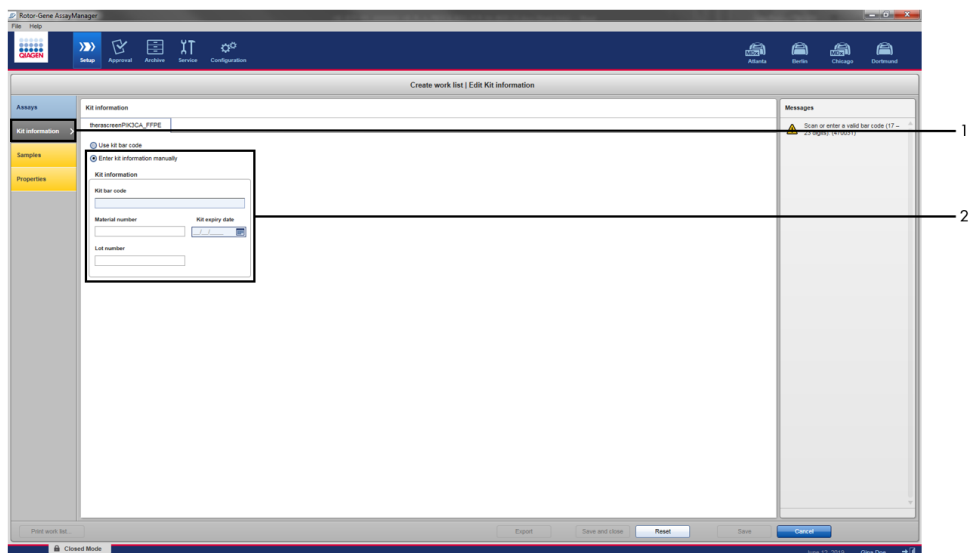
16. Voer in het venster "Selected assay profiles" (Geselecteerde assayprofielen) het aantal testmonsters in dat moet worden getest, uitgezonderd het aantal runcontroles (Afbeelding 8).



Afbeelding 8. Hoofdenster voor maken van werkljst. 1 = Het aantal monsters toevoegen.

17. Klik op het tabblad "Kit information" (Informatie over de kit). Selecteer Enter kit information manually (Informatie over kit handmatig invoeren) en voer de volgende informatie over de kit in (Afbeelding 9):

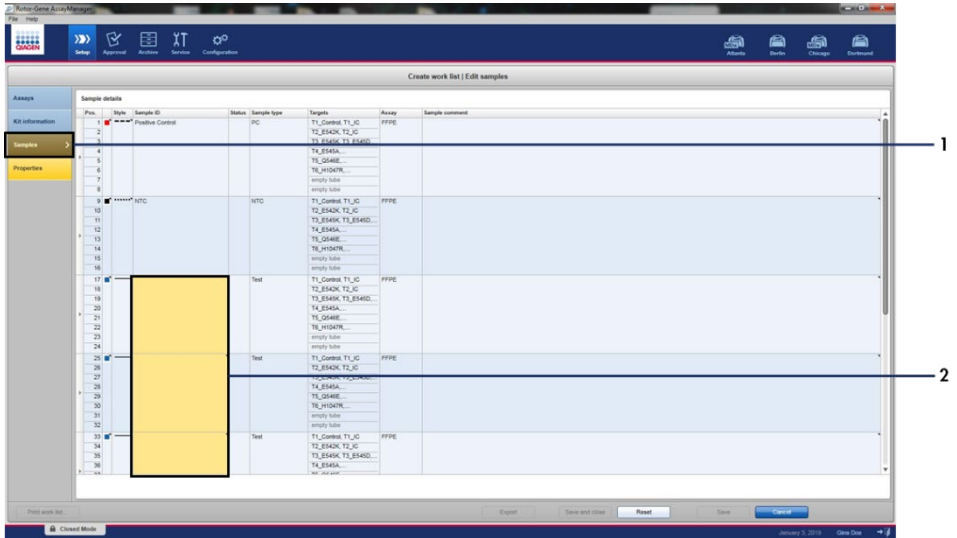
- Kit bar code (Barcode kit)
- Material number (Materiaalnummer)
- Lot number (Partijnummer)
- Kit expiry date (Vervaldatum kit)



Afbeelding 9. Hoofdvenster voor maken van werklĳst. 1 = Tabblad "Kit information" (Informatie over de kit), 2 = Informatie over de kit invoeren.

18. Klik op het tabblad "Samples" (Monsters) om informatie over de monsters in te voeren. Voer de monsternamen handmatig in (Afbeelding 10).

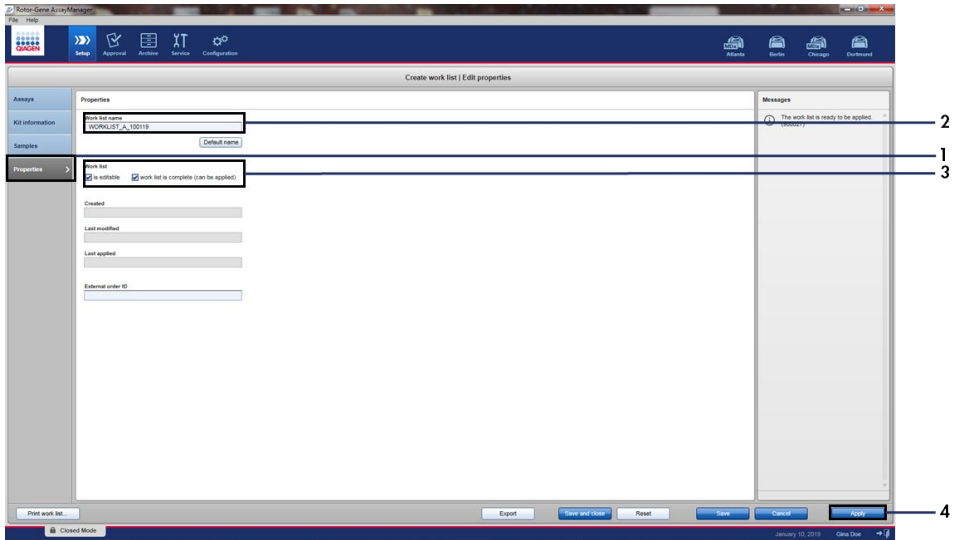
Opmerking: Controleer of de juiste monsternamen zijn ingevoerd voordat de Rotor-Gene AssayManager-run wordt gestart.



Afbeelding 10. Hoofdvenster voor maken van werklĳst. 1 = Tabblad "Samples" (Monsters), 2 = De monsternamen invoeren.



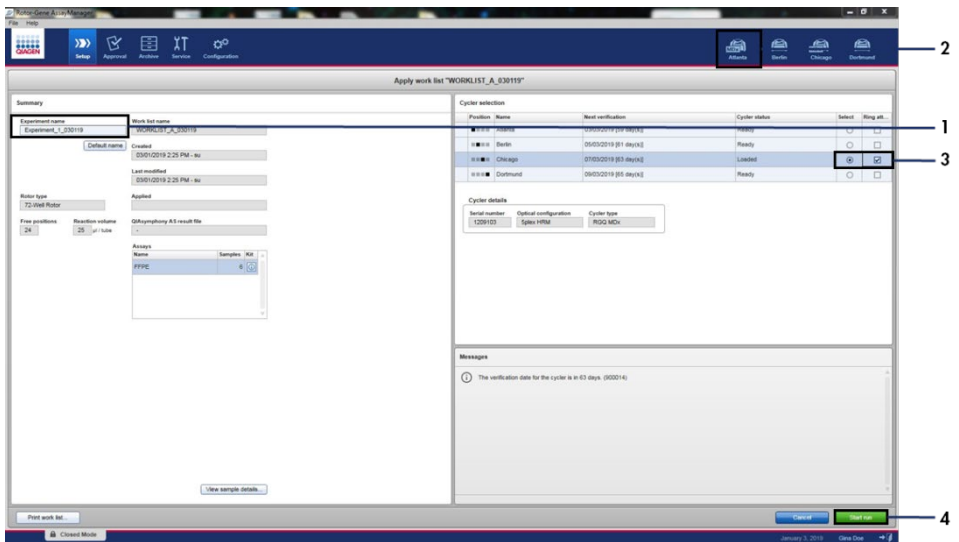
19. Klik op het tabblad "Properties" (Eigenschappen) en voer de naam van de werklIJst in. Nadat de naam van de werklIJst is ingevoerd, controleert u of de selectievakjes is editable (kan worden bewerkt) en work list is complete (werklIJst is voltooid) zijn aangevinkt. Klik rechtsonder op Apply (Toepassen) om de werklIJst toe te passen. Er verschijnt een nieuw venster (Afbeelding 11).



Afbeelding 11. Hoofdvenster voor maken van werklIJst. 1 = Tabblad "Properties" (Eigenschappen), 2 = De naam van de werklIJst invoeren, 3 = "is editable" (kan worden bewerkt) en "work list is complete" (werklIJst is voltooid) selecteren, 4 = "Apply" (Toepassen).

20. Voer een naam in voor het experiment in het veld Experiment name (Naam experiment).  
 Selecteer een cycler in de lijst met beschikbare cyclers en controleer of het selectievakje Ring attached (Ring aangebracht) is aangevinkt (Afbeelding 12).

Zodra alle stappen zijn uitgevoerd, klikt u op Start run (Run starten). Het RGQ-pictogram linksboven in het scherm wordt groen om aan te geven dat de run is gestart.



Afbeelding 12. Werklijst toepassen en run starten. 1 = Naam van experiment invoeren, 2 = Instrument selecteren, 3 = Controleren of "Ring attached" (Ring aangebracht) is geselecteerd, 4 = Run starten.

Opmerking: Het pictogram "Cycler" krijgt afhankelijk van de voortgang en het resultaat van de run een ander uiterlijk. Volledige beschrijvingen van deze cyclerpictogrammen vindt u in de *Gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Voorbeelden van de cyclerpictogrammen vindt u in Afbeelding 13.



Afbeelding 13. Mogelijke cyclerpictogrammen die worden weergegeven.

21. Zodra de run is voltooid, klikt u op Finish run (Run beëindigen). Het dialoogvenster "Release and go to approval" (Vrijgeven en naar goedkeuring gaan) wordt geopend (Afbeelding 14).

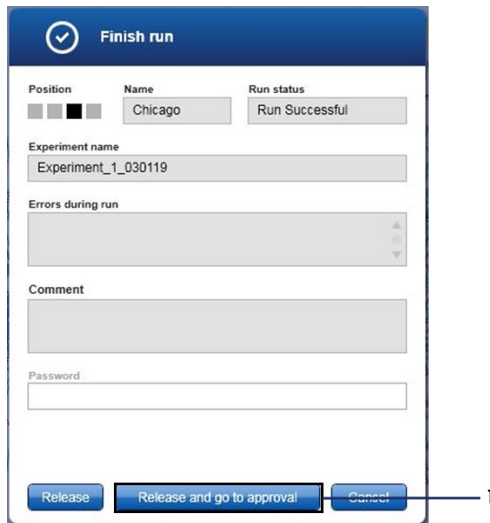
Opmerking: Tijdens de run worden de amplificatiecurven in real-time weergegeven en bijgewerkt. Linksonder wordt de resterende tijd aangeduid met een voortgangsindicator.

Belangrijk: Sluit het venster niet terwijl de run wordt uitgevoerd.



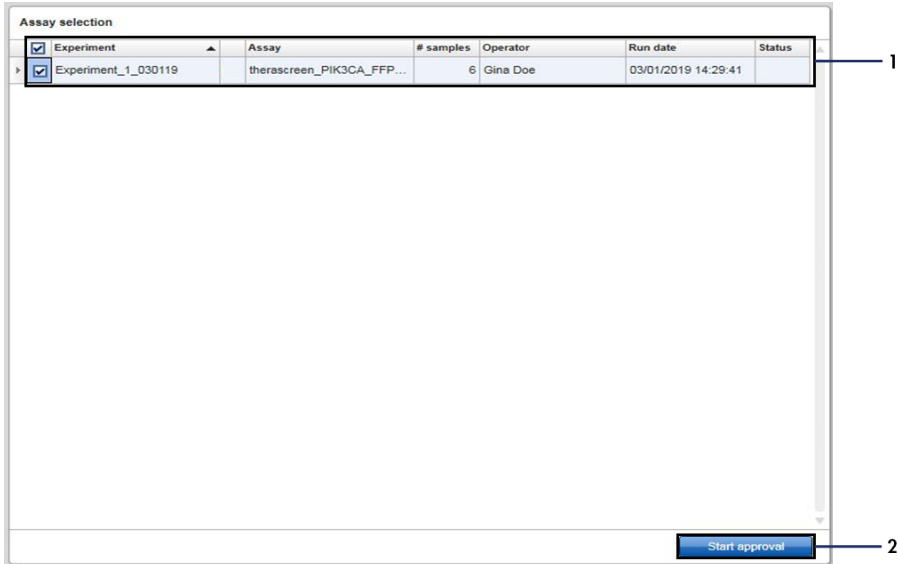
Afbeelding 14. Beëindigen van een run. 1 - "Finish run" (Run beëindigen).

22. Klik op Release and go to approval (Vrijgeven en naar goedkeuring gaan) om het tabblad "Approval" (Goedkeuring) te openen en het Rotor-Gene Q-instrument vrij te geven (Afbeelding 15). Het RGQ-pictogram rechtsboven in het scherm verandert van groen in blauw om aan te geven dat het instrument gereed is voor een volgende run. Ongeacht of een run wel of niet geslaagd is, moet de run worden vrijgegeven en goedgekeurd. Zie de *Gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* en de *Gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in* voor een lijst met mogelijke storingen en foutcodes in Rotor-Gene AssayManager.



Afbeelding 15. Pop-upvenster "Finish Run" (Run beëindigen). 1 = "Release and go to approval" (Vrijgeven en naar goedkeuring gaan).

23. Selecteer het experiment in het gedeelte "Assay selection" (Assayselectie) van de omgeving Approval (Goedkeuring) en klik op Start approval (Goedkeuring starten) (Afbeelding 16).



Afbeelding 16. Het vrijgaveproces starten in de omgeving "Approval" (Goedkeuring). 1 = Geselecteerd assay voor goedkeuring, 2 = "Start approval" (Goedkeuring starten).

Informatie over "Raw data" (Onbewerkte gegevens), "Processed data" (Verwerkte gegevens), "Experiment", "Assay" en "Audit trail" (Audittrail) vindt u in het gedeelte "Plots and information" (Plots en informatie) (1). Assayresultaten vindt u in het gedeelte "Results" (Resultaten) (2).

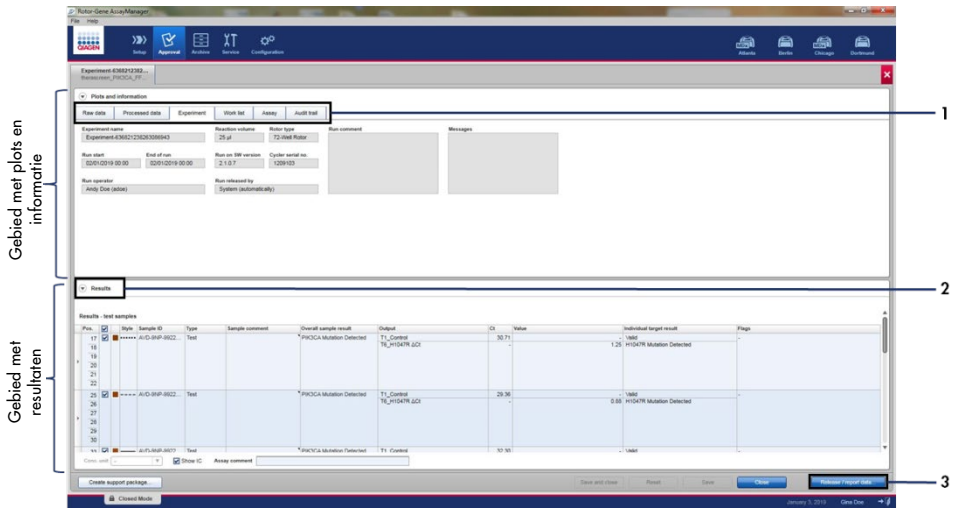
Als de positieve controle en de controle zonder template binnen een aanvaardbaar bereik vallen, wordt Valid (Geldig) weergegeven in de kolom "Sample Status" (Monsterstatus). Anders is de monsterstatus Invalid (Ongeldig).

Als een van de runcontroles mislukt, wordt de run hierdoor ongeldig. Alle monsters worden aangemerkt als ASSAY\_INVALID.

Zie "Waarschuwingsberichten van Rotor-Gene AssayManager v2.1 theascreen PIK3CA-assayprofiel" (pagina 52) voor instructies hoe u moet verdergaan.

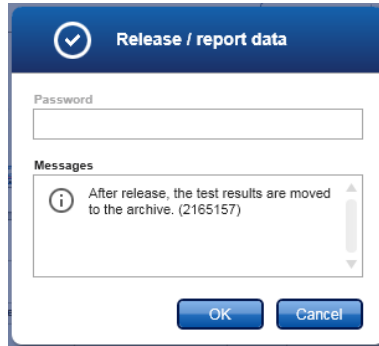
Opmerking: Het assayprofiel bevat alle regels voor automatische assay en monsteranalyse en resultaatinterpretatie. De geldigheid of ongeldigheid van monsters en controles wordt daarom automatisch door de software beoordeeld.

24. Klik op Release/report data (Gegevens vrijgeven/rapporteren). Het venster "Release/report data" (Gegevens vrijgeven/rapporteren) wordt geopend (Afbeelding 17).



Afbeelding 17. Voorbeeld van hoofdvensters met assayresultaten. 1 = Tabblad "Experiment" in het gebied "Plots and information" (Plots en informatie). 2 = Gebied met resultaten, 3 = "Release/report data" (Gegevens vrijgeven/rapporteren).

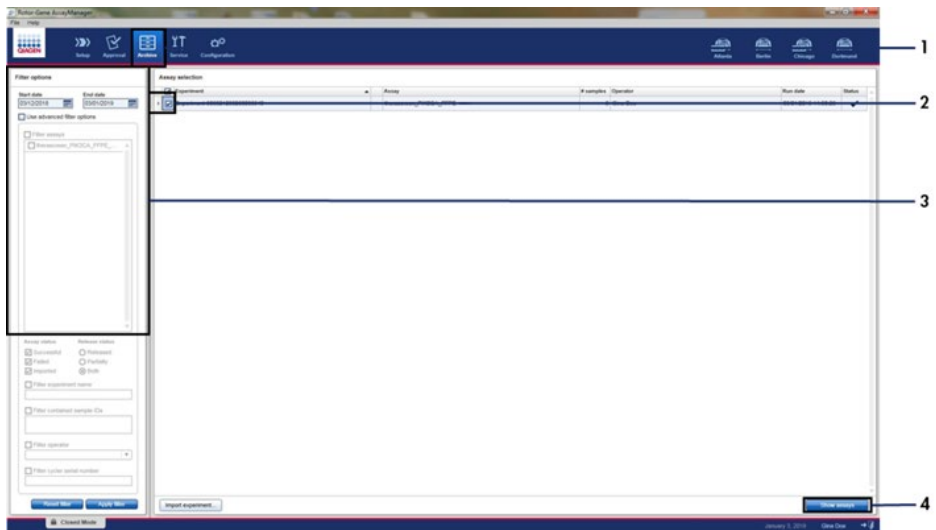
25. Klik op OK om het experiment in het archief op te slaan en een LIMS-output en runrapport maken (Afbeelding 18). Runrapporten en LIMS-exporten worden in de standaarddirectory voor rapporten opgeslagen. De standaarddirectory vindt u in "Default data export directories" (Standaard gegevensexportdirectory's) op het tabblad "Configuration" (Configuratie).



Afbeelding 18. Voorbeeld van venster "Release/report data" (Gegevens vrijgeven/rapporteren).



26. Als u een experiment wilt bekijken dat is opgeslagen in het experimentarchief, klikt u op Archive (Archief) en zoekt u het experiment met behulp van de zoekcriteria in het gedeelte "Filter Options" (Filteropties). Klik op Apply filter (Filter toepassen) om de zoekopdracht te starten. Selecteer een experiment door het selectievakje ernaast aan te vinken en klik op Show assays (Assays tonen) (Afbeelding 19).



Afbeelding 19. Voorbeeld van hoofdenster "Experiment Archive" (Experimentarchief). 1 = Tabblad "Archive" (Archief), 2 = Zoekopties, 3 = Experimentnaam selecteren, 4 = tabblad "Show assays" (Assays tonen).

---

# Resultaten

Na afloop van een run worden de resultaten automatisch geanalyseerd en mutaties geïdentificeerd door het *therascreen* PIK3CA-assayprofiel. Hieronder wordt uitgelegd hoe het *therascreen* PIK3CA-assayprofiel te werk gaat tijdens de analyse en de identificatie van de mutaties.

## Analyse

De PCR-cyclus waarbij de fluorescentie van een reactie de vastgestelde drempelwaarde overschrijdt zoals aangeduid in het *therascreen* PIK3CA-profiel, wordt gedefinieerd als de  $C_T$ -waarde. De  $C_T$ -waarde is een maat voor de hoeveelheid specifiek DNA in het uitgangsmateriaal. Een lage  $C_T$ -waarde duidt op een hogere concentratie DNA in het uitgangsmateriaal en een hoge  $C_T$ -waarde geeft aan dat er weinig DNA in het uitgangsmateriaal aanwezig is. Reacties waarbij de fluorescentie de drempelwaarde op of vóór deze  $C_T$ -waarde overschrijdt, worden geclassificeerd als positief.

Door het DNA-monster te beoordelen aan de hand van de controlereactie kan op basis van de verkregen  $C_T$ -waarden worden vastgesteld of de monsters DNA-concentraties bevatten die geschikt zijn voor analyse en welke monsters voorafgaand aan de analyse moeten worden verdund.

Door de monsters met de verschillende mutatiereactiemengsels te beoordelen om de betreffende  $C_T$ -waarden vast te stellen, kan het *therascreen* PIK3CA-assayprofiel een berekening uitvoeren om de  $\Delta C_T$ -waarde van het monster vast te stellen met de volgende vergelijking:

$$\Delta C_T = [C_T\text{-waarde van de mutatie-assay}] - [C_T\text{-waarde van de controle-assay}]$$

Op basis van een vooraf vastgestelde analytische  $C_T$  en  $\Delta C_T$ -waarden voert het *therascreen* PIK3CA-assayprofiel een kwalitatieve bepaling uit van de mutatiestatus van de DNA-monsters en wordt een melding gemaakt als een monster een of meer mutaties bevat.

---

De controles van de run (PC, NTC en de IC) worden beoordeeld om te controleren of de  $C_T$ -waarden binnen het aanvaardbare bereik liggen en of de reacties naar behoren hebben plaatsgevonden.

Als de controle- $C_T$  van het monster onder het aanvaardbare bereik valt, geeft dit aan dat de DNA-invoer te hoog is en dat het monster moet worden verdund zoals beschreven in "Waarschuwingsberichten van Rotor-Gene AssayManager v2.1 *therascreen* PIK3CA-assayprofiel", pagina 52.

Al deze beoordelingen worden automatisch uitgevoerd en vereisen geen handmatige interpretatie. De validiteit van de run en validiteitscriteria van monsters worden automatisch gecontroleerd en er wordt geen mutatiestatus gemeld in het geval van een ongeldig monster of ongeldige run.

De Rotor-Gene AssayManager v2.1 software berekent het resultaat van elke beoogde biomarker door alle relevante analyseresultaten te combineren op basis van kernanalyse-algoritmen, zoals normalisatie en monster- en assayregels zoals gedefinieerd in het desbetreffende assayprofiel.

De volgende resultaten kunnen aan één monster worden toegewezen:

- PIK3CA Mutation Detected (PIK3CA-mutatie gedetecteerd)
- No Mutation Detected (Geen mutatie gedetecteerd)
- INVALID (ONGELDIG): Als er tijdens de analyse door de Rotor-Gene AssayManager v2.1 software een of meerdere waarschuwingsberichten aan het monster worden toegewezen die zo zijn gedefinieerd dat zij het targetresultaat op "INVALID" (ONGELDIG) zetten.

Opmerking: Als er tijdens de run een fout is opgetreden, moeten de monsters in de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM worden weggegooid. Deze mogen niet opnieuw worden getest.

---

## Waarschuwingsberichten van Rotor-Gene AssayManager v2.1 *therascreen* PIK3CA-assayprofiel

Alle mogelijke waarschuwingsberichten die bij de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in horen, worden vermeld in de *Gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

In Tabel 6 staan de mogelijke waarschuwingsberichten die kunnen voorkomen in de *therascreen* PIK3CA-assayprofielen, wat ze betekenen en welke maatregelen er genomen moeten worden.

Uit de naam van het waarschuwingsbericht blijkt om welke component van de kit, welk monster of welke controle het gaat en welke fout er is opgetreden.

Bijvoorbeeld:

- PC\_CTRL\_ASSAY\_FAIL = de positieve controle (PC) van de controle-assay (CTRL\_ASSAY) is mislukt (FAIL)
- NTC\_INT\_CTRL\_FAIL = de controle zonder template (NTC), de interne controle (INT\_CTRL) is mislukt (FAIL)
- SAMPLE\_CTRL\_HIGH\_CONC = het monster (SAMPLE), de controle-assay (CTRL) heeft een hoge concentratie (HIGH\_CONC)

Tabel 6. Softwarewaarschuwingen van de PIK3CA-assayprofielen

Waarschuwingbericht	Betekenis	Actie
IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ongeldige run. IC-waarde boven het specificatiebereik in PC- of NTC-buisjes.  Ongeldig monster. IC in monster valt boven het specificatiebereik.	Herhaal run.  Test het monster één keer opnieuw. Als de IC $C_T$ van het monster na de nieuwe test nog steeds boven het aanvaardbare bereik valt, moet het monster opnieuw worden geëxtraheerd. Als de IC van het monster na re-extractie en twee testronden nog steeds boven het aanvaardbare bereik valt, moet het monster worden gerapporteerd als onbepaald.
(PC)_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ongeldige run. PC valt boven het specificatiebereik.	Herhaal run.
(PC)_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Ongeldige run. PC valt onder het specificatiebereik.	Herhaal run.
IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Ongeldige run. IC valt onder het specificatiebereik in PC- of NTC-buisjes.  Ongeldig monster. IC in monster valt onder het specificatiebereik	Herhaal run.  Test het monster één keer opnieuw. Als de IC $C_T$ van het monster na de nieuwe test nog steeds onder het aanvaardbare bereik valt, moet het monster opnieuw worden geëxtraheerd. Als de IC van het monster na re-extractie en twee testronden nog steeds onder het aanvaardbare bereik valt, moet het monster worden gerapporteerd als onbepaald.
UNEXPECTED_CT_VALUE	Ongeldige run. $C_T$ -waarde is gedetecteerd in NTC.	Herhaal run.
NO_CT_VALUE	Ongeldige PC of IC. Geen $C_T$ -waarde voor PC in PC-buisjes of voor IC in PC- en NTC-buisjes.  Ongeldig monster. Geen $C_T$ -waarde in monster.	Herhaal run.  Test het monster één keer opnieuw. Als er na de nieuwe test nog steeds geen IC $C_T$ is, moet het monster opnieuw worden geëxtraheerd. Als er na re-extractie en twee testronden nog steeds geen IC van het monster is, moet het monster worden gerapporteerd als onbepaald.

Tabel wordt vervolgd op de volgende pagina

Tabel 6. Softwarewaarschuwingen van de PIK3CA-assayprofielen (vervolg)

Waarschuwingbericht	Betekenis	Actie
DNA_INPUT_TOO_HIGH	Ongeldig monster. Controle-C <sub>T</sub> -waarde van monster valt onder het controlewerkbereik.	Monster is te geconcentreerd en moet worden verdund. Volg instructies in "Controle-C <sub>T</sub> -waarde", pagina 54.
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ongeldig monster. Controle-C <sub>T</sub> -waarde van monster valt boven het controlewerkbereik.	Test het monster één keer opnieuw. Als de controle-C <sub>T</sub> -waarde na de nieuwe test nog steeds boven het controlewerkbereik valt, moet het monster opnieuw worden geëxtraheerd. Als de controle-C <sub>T</sub> -waarde na re-extractie en twee testronden nog steeds boven het controlewerkbereik valt, moet het monster worden gerapporteerd als onbepaald.
T1_CONTROL_NO_CT_VALUE	Ongeldig monster. Geen C <sub>T</sub> -waarde voor monster in monstercontrolebuisjes	Test het monster één keer opnieuw. Als het monster na de test geen C <sub>T</sub> -waarde heeft, moet het monster opnieuw worden geëxtraheerd. Als het monster nog steeds geen C <sub>T</sub> -waarde heeft na re-extractie en twee testronden, moet het monster worden gerapporteerd als onbepaald.

Opmerking: Als een opnieuw getest monster bij het herhalen om een andere reden ongeldig is, wordt dit nog steeds geclassificeerd als een tweede herhaling en moet het monster opnieuw worden geëxtraheerd.

## Controle-C<sub>T</sub>-waarde

Er zijn twee mogelijke waarschuwingberichten voor een ongeldig monster als gevolg van de controle-C<sub>T</sub>-waarde:

- **DNA\_INPUT\_TOO\_HIGH:** Monster is te geconcentreerd voor de mutatie-assays. Om een geldig monsterresultaat te verkrijgen, moet het monster worden verdund. De vuistregel bij het verdunnen van monsters is dat bij een twee keer zo hoge verdunningsfactor de C<sub>T</sub>-waarde met 1 toeneemt. Gebruik voor het verdunnen van monsters het water voor verdunnen uit de kit (Dil.).

Berekenen van de vereiste verschuiving van de controle- $C_T$ -waarde ( $X_R$ ) en schatten van de vereiste verdunningsfactor (Tabel 7):

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

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

Daarbij is 25 (voor FFPE-specimens) of 27 (voor plasmaspecimens) de beoogde controle- $C_T$ -waarde voor het verdunde monster en is  $X$  een feitelijke controle- $C_T$ -waarde van het monster dat moet worden verdund.

Als  $X$  niet een geheel getal is, rond dit dan af naar het volgende gehele getal. 2,1 wordt bijvoorbeeld afgerond naar 3,0. Deze waarde is  $X_R$ . Vind de beoogde verdunningsfactor in Tabel 7.

Tabel 7. Berekening van verdunningsfactor

$X_R$	Verdunningsfactor	Monsterverhouding	Verdunningsverhouding
1	2-voudig	1	1
2	4-voudig	1	3
3	8-voudig	1	7
4	16-voudig	1	15
5	32-voudig	1	31
6	64-voudig	1	63
7*	128-voudig	1	127
8*	256-voudig	1	255

\* Alleen voor plasma.

- **ABOVE\_ACCEPTED\_RANGE** en **T1\_CONTROL\_NO\_CT\_VALUE**: De hoeveelheid DNA is onvoldoende voor mutatie-analyse. Test het monster opnieuw als er voldoende DNA-eluaat beschikbaar is (>30  $\mu$ l). Als de hoeveelheid DNA bij de nieuwe test nog steeds onvoldoende is, voer dan een nieuwe extractie uit op verse FFPE-coupees of een vers plasmaspecimen. Als dit niet mogelijk is, moet het monster worden gerapporteerd als onbepaald.

---

# Prestatiekenmerken: weefselspecimens

## Analyseprestaties: weefselspecimens

De specifieke prestatiekenmerken van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit zijn vastgesteld door middel van onderzoeken met FFPE-weefselspecimens afgenomen bij borstkankerpatiënten en 12 menselijke FFPE-cellijspecimens (FFPE-cellijspecimens) die bekende *PIK3CA*-mutatie bevatten die door de assay worden gedetecteerd, plus één wild-type *PIK3CA*-specimen (d.w.z. geen claim van mutatiedetectie door de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit in exon 7, 9 en 20).

## Blancolimiet (Limit of Blank, LoB): Weefselspecimens

De LoB wordt in CLSI-richtlijn EP17-A2 gedefinieerd als "het hoogste meetresultaat dat waarschijnlijk wordt geobserveerd (met een vermelde waarschijnlijkheid) voor een blanco monster". Voor de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is dit het gegevenspunt dat overeenkomt met het bovenpercentiel van 95% in de mutatienegatieve monster. De LoB is vastgesteld aan de hand van analyse van 56 afzonderlijke klinische wild-type FFPE-specimens (30 RES-specimens en 26 CNB-specimens) die in tweevoud zijn getest per monster voor elk van de drie partijen van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, waarbij in totaal 336 gegevenspunten zijn gegenereerd. De LoB-waarden voor elk van de mutatie-assays (wat betreft  $\Delta C_T$ ) zoals gedetecteerd door de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit waren geverifieerd boven de  $\Delta C_T$ -limietwaarden zoals vastgesteld voor elk van de assays en worden hieronder samengevat, samen met de verkregen foutpositieve resultaatpercentages.



Tabel 8. Overzicht van LoB-resultaten

Exon	Mutatie	Baseverandering	LoB ( $\Delta C_T$ -waarde)	Foutpositief resultaatpercentage (%)
7	C420R	1258T>C	7,57	0,94
9	E542K	1624G>A	5,09	1,88
	E545A	1634A>C	13,03	0,00
	E545D	1635G>T	9,19	0,31
	E545G	1634A>G	13,03	0,00
	E545K	1633G>A	6,74	1,57
	Q546E	1636C>G	13,03	0,00
	Q546R	1637A>G	8,72	0,00
	20	H1047L	3140A>T	12,63
H1047R		3140A>G	9,80	1,25
H1047Y		3139C>T	7,61	0,63

## Detectielimiet (Limit of Detection, LoD): Weefsel-specimens

Er werd een onderzoek uitgevoerd om de LoD voor elk van de 11 *PIK3CA*-mutaties vast te stellen. De LoD werd gedefinieerd als de kleinste hoeveelheid mutant DNA tegen een achtergrond van wild-type DNA waarbij een monster met mutaties een mutatiepositief resultaat oplevert bij 95% van de testresultaten ( $C_{95}$ ). De LoD's voor de 11 *PIK3CA*-mutatie-assays van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit worden gerapporteerd als MAF. Om de LoD voor elke mutatie te bepalen, werden klinische FFPE-specimens of FFPE-celijn-DNA met borstkanker met verschillende mutatiepercentages bereid met een lage uitgangskonzentratie DNA door deze serieel te verdunnen in een klinische wild-type FFPE-achtergrond. Voor elke *PIK3CA*-mutatie werd het percentage correcte resultaten vastgesteld met verschillende verdunningsniveaus met gebruik van drie verschillende partijen van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit, waarbij 24 replica's werden getest per kitpartij per vijf tot zes MAF-niveaus. Voor elke assay werd de LoD berekend met behulp van een probitmethode (Tabel 9). De uiteindelijke LoD-waarde voor elke mutatie werd vastgesteld als de hoogste waarde (wat betreft MAF) van alle partijen van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Om de LoD te verifiëren, werden er mutatiemonsters bij de vastgestelde LoD getest en werd het percentage positieve tests geverifieerd in het onderzoek naar herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid.

Tabel 9. LoD voor weefselspecimens zoals vastgesteld met monsters met lage ingangconcentratie DNA uit klinische FFPE-specimens en FFPE-cellijspecimens

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

MAF: Mutant-allelfrequentie.

\* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

<sup>†</sup> LoD-waarden werden vastgesteld op basis van DNA uit cellijspecimens.

<sup>‡</sup> LoD-waarden werden vastgesteld op basis van DNA uit klinische specimens.

## Uitgangsbereik genomisch DNA: Weefselspecimens

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit gebruikt geen specifieke DNA-concentratie zoals vastgesteld aan de hand van spectrofotometrie. De uitgangconcentratie DNA is gebaseerd op het C<sub>T</sub>-resultaat van de controlereactie, waarmee wordt aangegeven dat het monster voldoende amplificeerbaar DNA bevat. Het werkbereik van controle-C<sub>T</sub>-waarden werd vastgesteld aan de hand van in totaal 20 wild-type klinische FFPE-specimens, hetgeen 107 gegevenspunten opleverde. Het werkbereik van controle-C<sub>T</sub>-waarden werd ingesteld met berekende tolerantie-intervallen. Het bereik voor de C<sub>T</sub>-waarde van de controlereactie werd vastgesteld op een C<sub>T</sub>-waarde tussen 23,23 en 33,38.

## $\Delta C_T$ -limietwaarden: Weefselspecimens

De assaylimietwaarde is een specifieke  $\Delta C_T$ -waarde die wordt gebruikt om te bepalen of een monster wordt geclassificeerd als positief of negatief voor een *PIK3CA*-mutatie. Monsters die een  $\Delta C_T$ -waarde opleveren op of onder de limiet, worden geclassificeerd als *PIK3CA*-mutatiepositief (d.w.z. *PIK3CA*-mutatie gedetecteerd) en die een  $\Delta C_T$ -waarde opleveren boven de limiet, worden geclassificeerd als *PIK3CA*-mutatienegatief (d.w.z. geen mutatie gedetecteerd). Er is een combinatie van cellijn-DNA, klinische specimens en pre-geëxtraheerd cellijn-DNA gebruikt om voor elke mutatie de limietwaarde vast te stellen. De limietwaarden zijn gekozen aan de hand van de volgende parameters: foutpositieve fractie, foutnegatieve fractie en assaygevoeligheid.

De limietwaarde voor elke assay in de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit wordt getoond in Tabel 10.

Tabel 10. Limietwaarden voor elke mutatie-assay bij het testen van DNA uit weefselspecimens

Assay	Limietwaarde ( $\Delta C_T$ )
C420R	$\leq 6,0$
E542K	$\leq 4,8$
E545A	$\leq 10,0$
E545D	$\leq 7,5$
E545G	$\leq 9,5$
E545K	$\leq 6,5$
Q546E	$\leq 10,0$
Q546R	$\leq 7,0$
H1047L	$\leq 10,0$
H1047R	$\leq 7,0$
H1047Y	$\leq 6,2$

## Effect van DNA in het uitgangsmateriaal op de $\Delta C_T$ -waarden (lineariteit): Weefsel-specimens

De uitgangskoncentratie DNA wordt gedefinieerd als de totale hoeveelheid amplificeerbaar DNA in een monster, zoals vastgesteld op basis van de  $C_T$ -waarden van de *PIK3CA*-controlereactie. Om aan te tonen dat de prestaties van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit consistent zijn in het gehele  $C_T$ -bereik voor de controlereactie (23,23 tot 33,38), werd een seriële verdunning met 9 niveaus met variërende uitgangskoncentraties DNA en waarbij de hoge en lage waarden buiten het  $C_T$ -werkbereik voor de controlereactie ( $C_T$  van 23,23–33,38) vielen, geëvalueerd met mutatiepositieve monsters. In dit onderzoek werden drie verschillende specimen typen gebruikt: klinische FFPE-resectiespecimens, FFPE-cellijspecimens en gDNA pre-geëxtraheerd uit cellijnen. De MAF-waarden werden constant gehouden, terwijl de uitgangskoncentratie DNA varieerde. De  $C_T$ -doelwaarden voor verdunningsniveaus 1 en 9 waren voor elke mutatie respectievelijk ongeveer 23,00 en 33,50. Beide waarden zijn bedoeld om buiten het  $C_T$ -bereik voor de controlereactie te vallen.

De evaluatie is uitgevoerd met één partij van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit, waarbij per DNA-niveau drie replica's werden getest. De gegevens werden geanalyseerd aan de hand van regressieanalyse om het lineaire bereik te bepalen. Om de assay te beoordelen als lineair in het gehele DNA-uitgangsbereik, dient er geen verandering te zijn in het  $\Delta C_T$ -bereik, d.w.z. er is geen statistisch significant lineair, kwadratisch of kubiek effect. In het algemeen waren de  $\Delta C_T$ -waarden die werden gemeten bij verschillende uitgangskoncentraties DNA consistent over het volledige werkbereik van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit voor de mutaties E542K, E545D, E545G, E545A, H1047Y, Q546E, C420R en H1047R. Dat wil zeggen dat deze assays geen statistisch significante p-waarde ( $p > 0,05$ ) lieten zien voor de lineaire, kwadratische en kubieke effecten voor alle geteste modellen. De assays E545K, Q546R en H1047L zijn niet lineair voor  $\Delta C_T$  in het geteste DNA-uitgangsbereik. Er is een lineair bereik geobserveerd voor de assay E545K tussen de  $C_T$ -waarden 24,08 en 31,02. Er is een lineair bereik geobserveerd voor de assay Q546R tussen de  $C_T$ -waarden 24,28 en 32,69. Er is een lineair bereik geobserveerd voor de assay H1047L tussen de  $C_T$ -waarden 25,74 en 31,61. Uit een onderzoek is gebleken dat de niet-lineaire effecten geen impact hadden op de prestaties van de assays E545K en H1047L. Er werd echter wel een effect op de prestaties van de assay Q546R vastgesteld. Monsters op de LoD kunnen foutnegatief worden genoemd wanneer de DNA-uitgangskoncentratie hoog is (een controle- $C_T$ -waarde van ongeveer 23), maar de waarschijnlijkheid dat dit gebeurt is extreem laag, ongeveer 0,0052%.

---

## Assayspecificiteit (kruisreactiviteit/specificiteit): Weefsel-specimens

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bestaat uit zes verschillende reactiemengsels: één controlereactie die een regio in exon 15 van het *PIK3CA*-gen detecteert en 11 mutatie-assays die *PIK3CA*-mutaties detecteren. Er is geen reactie waarmee specifiek de wild-type *PIK3CA*-sequentie bij exon 7, 9 of 20 wordt gemeten. Het resultaat "No Mutation Detected" (Geen mutatie gedetecteerd) van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit wordt bepaald door de afwezigheid van positieve mutatiereultaten.

Om te beoordelen of kruisreactiviteit tussen mutaties die zijn gedetecteerd door de assay correct is verwerkt in de instelling van de analytische limietwaarden, zijn mutantpositieve klinische specimens en cellijnspecimens in tweevoud getest met behulp van drie partijen van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bij een lage DNA-uitgangconcentratie en laag MAF% en een hoge DNA-uitgangconcentratie en hoog MAF% (in totaal leverde dit 240 gegevenspunten op). In dit onderzoek was er één geval van kruisreactiviteit tussen E545D en H1047R en één geval tussen C420R en H1047R. Bovendien waren er vier gevallen van niet-mutantspecifieke amplificatie tussen het hoge MAF-monster van E545A en H1047L. In het algemeen werd niet-mutantspecifieke amplificatie in 6/240 gegevenspunten aangetoond. De zes gegevenspunten die niet-mutantspecifieke amplificatie aantoonden, waren sporadisch en inconsistent met andere replica's van hetzelfde monster. Deze resultaten werden derhalve niet beschouwd als een resultaat van kruisreactiviteit. PCR-kruisreactiviteit werd echter geobserveerd tussen H1047L en H1047R. Deze kruisreactiviteit verloopt in één richting, dus als er een dubbel H1047R- en H1047L-monster wordt gezien, wordt dit alleen gemeld als "H1047R Mutation Detected" (H1047R-mutatie gedetecteerd). Deze regel is opgenomen in het automatische algoritme van het assayprofiel "*therascreen*\_PIK3CA\_FFPE".

---

## Verstoring: Weefselspecimens

### Effecten van necrotisch weefsel

Om de mogelijke verstoring van necrotisch weefsel in FFPE-specimens van borstkanker op de prestaties van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit te evalueren, werden de resultaten voor klinische FFPE-specimens uit SOLAR-1 met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en met Next Generation Sequencing (NGS) geanalyseerd. Er werden in totaal 180 *PIK3CA*-mutantnegatieve specimens aan de hand van NGS en 199 *PIK3CA*-mutantpositieve specimens aan de hand van NGS geëvalueerd. Dit omvatte CNB- en RES-specimens. Het percentage necrose, zoals geïdentificeerd door een patholoog, varieerde van 0 tot 10% voor mutantnegatieve monsters en 0 tot 20% voor mutantpositieve monsters.

Voor zowel mutantpositieve als mutantnegatieve FFPE-specimens hadden 20 monsters resultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit die niet overeenkwamen met de verwachte NGS-resultaten. Deze resultaten waren afkomstig van 17 mutantnegatieve en twee mutantpositieve monsters met een necrotische inhoud van minder dan 5%, en één mutantnegatief monster met een necrotische inhoud van minder dan 10%. Het is dus onwaarschijnlijk dat necrose de oorzaak was van de tegenstrijdige resultaten. De resultaten bekrachtigen het gebruik van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit met FFPE-specimens van borstkanker met maximaal 20% necrotisch weefsel.

### Effecten van hemoglobine en exogene stoffen

Het effect van mogelijk interfererende stoffen die worden geïntroduceerd vanuit de FFPE-extractiekit (een exogene stof) of uit het monster zelf (hemoglobine) op de assayprestaties werden gemeten aan de hand van een vergelijking van de  $\Delta C_T$ -waarde tussen extracten van elke mutant waaraan interfererende stof of een controle is toegevoegd, en een vergelijking van de correcte resultaten voor wild-type DNA-monsters.

De aanwezige exogene stoffen in het DNA-extractieproces die zijn getest:

- Paraffinewas
- Xyleen

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

Monsters waaraan exogene interfererende stoffen werden toegevoegd, werden eerst genormaliseerd tot een  $C_T$ -waarde van 30,00 en vervolgens verdund met wild-type (ook genormaliseerd tot een  $C_T$ -waarde van 30,00). Dit leverde de verwachte  $\Delta C_T$ -waarde op bij een MAF van  $3 \times \text{LoD}$ . Monsters waaraan hemoglobine (een endogene interfererende stof) werd toegevoegd tijdens het extractieproces, werden niet genormaliseerd tot een  $C_T$ -waarde van 30,00 of verdund tot  $3 \times \text{LoD}$  voorafgaand aan de mutatiebeoordeling. In plaats daarvan werden ze onmiddellijk na de extractie gebruikt. Dit voorkwam dat eventuele variabiliteit die door de interfererende stof was geïntroduceerd, werd weggenomen.

Voor het onderzoek moest een testmonsterset en een blanco monsterset (Buffer ATE voor exogene stoffen en water voor hemoglobine) worden voorbereid. De testmonsterset omvatte alle mutant- en wild-type monsters waaraan een interfererende stof was toegevoegd. De blanco monsterset omvatte mutant- en wild-type monsters waaraan een passende controlestof was toegevoegd. Testmonsters met hemoglobine kregen tijdens het extractieproces hemoglobine toegevoegd om introductie via het FFPE-monster na te bootsen. De testconcentratie hemoglobine en het geschatte weefselvolume zoals gebruikt in het extractieproces waren gebaseerd op CLSI-richtlijnen (CLSI EP7-A2, bijlage D, 2005, Interference Testing in Clinical Chemistry (Interferentietesten in klinische chemie); goedgekeurde richtlijn). De aanbevolen testconcentratie hemoglobine zoals aangeduid in EP07-A, bijlage D, 2005 is 2 mg/ml. Aan de testmonsters met mogelijke exogene interfererende stoffen, werden de stoffen toegevoegd na normalisatie tot een  $C_T$ -waarde van 30,00 en verdunning tot  $3 \times \text{LoD}$  bij een concentratie die staat voor de hoogst mogelijke (worst-case) carry-over van de interfererende stof in een monster (10x concentratie). In totaal

zijn zes replica's van elke combinatie van monster en interfererende stof getest met één partij van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Alle mutatiresultaten in zowel mutant- als wild-type monsters waren zoals verwacht. Wanneer een significant verschil werd waargenomen tussen monsters met toegevoegde stof en controlemonsters, viel dit binnen de aanvaardbare intermediaire nauwkeurigheid van de assay en viel dit derhalve binnen de inherente variatie van de assay. Uit de resultaten bleek dat deze stoffen niet interfereerden met de resultaten van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

## Uitwisselbaarheid van partijen: weefsel-specimens

Het *therascreen* PIK3CA RGQ PCR-systeem maakt gebruik van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit voor de isolatie van DNA en de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit voor de amplificatie van DNA en het vaststellen van de *PIK3CA*-mutatiestatus. De reproduceerbaarheid tussen partijen werd aangetoond met drie partijen van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit en drie partijen van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Het totale percentage correcte resultaten tussen partijen was 96,8% (363/375) voor alle mutatiepositieve en wild-type monsters.

## Hanteren van specimen: Weefsel-specimens

De reproduceerbaarheid van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit werd onderzocht op basis van coupes van 11 FFPE-specimenblokken; vier klinische borstkankerspecimens voor *PIK3CA*-mutatie, zes cellijnspecimens voor *PIK3CA*-mutatie en één klinisch wild-type borstkankerspecimen. Voor elk specimen werden op drie locaties door twee laboranten extracties uitgevoerd in drievoud. Dit leverde in totaal 18 gegevenspunten per specimen op. Op elke locatie werd de test uitgevoerd met één partij van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit en één partij van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-reagentia. Alle geldige mutant- en wild-type specimenresultaten leverde het verwachte algehele mutatiestatusresultaat op (correct resultaat = 100%, 18/18 voor elk specimen). Voor verschillende specifieke *PIK3CA*-mutatiresultaten was de proportie van correcte resultaten 97,92%. Dit bevestigt de reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid voor de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bij de pre-analysestap van DNA-isolatie.



---

## Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid: Weefsel-specimens

De precisie en reproduceerbaarheid van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit werden onderzocht door DNA te testen dat door extractie was verkregen uit klinische FFPE-borstkankerspecimens voor PIK3CA-mutaties E542K, E545G, E545K, H1047L, H1047R en Q546R, en uit FFPE-celijnmonsters voor PIK3CA-mutaties C420R, E545A, E545D, H1047Y, Q546E en Q546R. Ook werden er klinische wild-type FFPE-borstspecimens opgenomen in het onderzoek (Tabel 11).

Om de herhaalbaarheid aan te tonen, werden monsters door drie laboranten in tweevoud getest op twee mutatieniveaus (LoD en 3x LoD) met twee runs per dag, verspreid over 20 niet-openvolgende dagen. Dit leverde op één locatie (in het Verenigd Koninkrijk) 120 gegevenspunten op, behalve voor monsters op LoD-niveau met de PIK3CA-mutaties E545A en Q546R. Monsters met de mutaties E545A en Q546R op LoD-niveau werden geëvalueerd gedurende zes dagen op één locatie door drie laboranten, met twee runs en vier replica's voor in totaal 144 metingen om de herhaalbaarheid aan te tonen. Voor de reproduceerbaarheid werden er per laborant (drie laboranten per locatie) twee runs per dag uitgevoerd op twee extra locaties (beide in de VS) verspreid over 10 dagen. Dit leverde 60 aanvullende gegevenspunten op voor elke aanvullende locatie, behalve voor monsters op LoD-niveau met de PIK3CA-mutaties E545A en Q546R. Monsters op LoD-niveau met de PIK3CA-mutaties E545A en Q546R werden geëvalueerd gedurende zes dagen voor twee extra locaties door drie laboranten, met twee runs en vier replica's voor in totaal 144 metingen per locatie, in totaal 432 verspreid over drie locaties. Op elke locatie werden monsters getest met twee partijen van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (drie partijen verspreid over drie locaties). Er zijn één tot twee partijen van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit gebruikt voor DNA-extractie uit FFPE-specimens. Monsters werden voorbereid op een lage DNA-uitgangconcentratie, gericht op een controle- $C_T$ -waarde van ongeveer 30.

Mutatiepositieve monsters werden uitsluitend uitgevoerd met het controlereactiemengsel en het relevante reactiemengsel van de beoogde mutatie. Wild-type monsters werden uitgevoerd met alle reactiemengsels.

Voor elk monster wordt de proportie van correcte resultaten in Tabel 11 getoond voor herhaalbaarheid.

Tabel 11. Herhaalbaarheid van assay – proportie van correcte resultaten voor *PIK3CA*-mutaties getest in DNA-monsters uit FFPE-weefselspecimens

Exon	Mutatie	Mutatieniveau	Fractionele proportie van geldige resultaten	Correcte resultaten, %	Ondergrens tweezijdig 95% BI
n.v.t.	Wildtype	n.v.t.	108/120	90,00	83,18
7	C420R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
9	E542K	LoD	119/119	100,00	96,95
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545A	LoD*	144/144	100,00	97,47
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545D	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545G	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545K	LoD	118/120	98,33	94,11
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	Q546E	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
Q546R	LoD*	139/140	99,29	96,08	
	3x LoD	119/119	100,00	96,95	
20	H1047L	LoD	117/120	97,50	92,87
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047Y	LoD	117/120	97,50	92,87
		3x LoD	120/120	100,00	96,97

N.v.t.: Niet van toepassing.

\* Monsters op LoD-niveau met de *PIK3CA*-mutaties E545A en Q546R werden door drie laboranten geëvalueerd gedurende zes dagen op één locatie, met twee runs en vier replica's voor in totaal 144 metingen.

Tabel 12. Reproduceerbaarheid van assay – proportie van correcte resultaten voor *PIK3CA*-mutaties getest in DNA-monsters uit FFPE-weefselspecimens

Exon	Mutatie	Mutatieniveau	Fractionele proportie van geldige resultaten	Correcte resultaten, %	Ondergrens tweezijdig 95% BI
n.v.t.	Wildtype	n.v.t.	222/240	92,50	88,41
7	C420R	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
9	E542K	LoD	237/239	99,16	97,01
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545A	LoD*	431/432	99,77	98,73
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545D	LoD	238/240	99,17	97,02
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545G	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545K	LoD	238/240	99,17	97,02
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	Q546E	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
Q546R	LoD*	421/424	99,29	97,95	
	3x LoD	239/239	100,00	98,47	
20	H1047L	LoD	230/240	95,83	92,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	H1047R	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	H1047Y	LoD	234/240	97,50	94,64
		3x LoD	240/240	100,00	98,47

N.v.t.: Niet van toepassing.

\* Monsters op LoD-niveau met de *PIK3CA*-mutaties E545A en Q546R werden door drie laboranten geëvalueerd gedurende zes dagen op drie locaties, met twee runs en vier replica's voor in totaal 144 metingen per locatie, 432 in totaal.

De standaarddeviatie voor de variabiliteit tussen kits, tussen runs, tussen laboranten, tussen instrumenten, tussen dagen en binnen een run werden geschat met behulp van een variantieanalyse voor de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid. Over alle

variantiecomponenten genomen bedroeg de totale standaarddeviatie (SD)  $\leq 1,32 \Delta C_T$  voor LoD en  $\leq 0,63 \Delta C_T$  voor 3x LoD voor alle *PIK3CA*-mutaties die werden getest in de reproduceerbaarheidstest. Over alle panel-onderdelen met mutaties bedroeg de SD  $\leq 0,17 \Delta C_T$  voor LoD en  $\leq 0,16 \Delta C_T$  voor 3x LoD tussen partijen (uitwisselbaarheid tussen partijen). De SD voor de variabiliteit binnen een run (herhaalbaarheid) bedroeg  $\leq 1,24 \Delta C_T$  voor LoD en  $\leq 0,53 \Delta C_T$  voor 3x LoD.

## Kruiscontaminatie/analytische carry-over: weefselspecimens

Het doel van dit onderzoek was om de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit te evalueren bij het testen van hoge *PIK3CA*-mutatiepositieve monsters naast *PIK3CA*-mutatienegatieve monsters. Dit onderzoek ging in op de waarschijnlijkheid van kruiscontaminatie tijdens de gehele testprocedure (DNA-extractie en daaropvolgend testen met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit).

Dit onderzoek werd uitgevoerd met H1047R (de mutatie met de hoogste prevalentie) en wild-type FFPE-cellijspecimens. Er werden twee afzonderlijke sets met monsters, "Set A" en "Set B" genoemd, geëxtraheerd volgens een vooraf gedefinieerde extractiematrix om het risico van kruiscontaminatie tussen monsters te introduceren. De extracties werden door twee laboranten uitgevoerd. Er werden in totaal 18 extracties (negen per set) uitgevoerd voor de mutatiepositieve (H1047R) monsters. Er werden in totaal 42 extracties (21 per set) uitgevoerd voor de wild-type monsters. De extracten werden beoordeeld op mutatie over tien PCR-runs; vijf per monsterset werden achtereenvolgens opgezet door dezelfde laborant met dezelfde apparatuur en Rotor-Gene Q-instrument, zonder dat er tussen deze runs andere runs werden opgezet met dit instrument. De extracten werden getest met het reactiemengsel van de controle-assay (buisje 1 van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit) en de beoogde mutatie (buisje 6 van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit).

Het geobserveerde percentage correcte mutatiresultaten voor geldige wild-type monsters bedroeg 100%. Dit toont aan dat er geen kruiscontaminatie van de wild-type monsters optrad door mutatiemonsters in dezelfde DNA-extractie en runinstallatie.

## Nauwkeurigheid: vergelijking met de analytische referentiemethode (weefselspecimens)

Om de nauwkeurigheid van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit aan te tonen ten opzichte van een gevalideerde NGS-assay, werd een nauwkeurigheidsonderzoek uitgevoerd met klinische FFPE-specimens van borstkankerpatiënten die werden gerandomiseerd in het SOLAR-1 onderzoek en waarvoor er een toereikende hoeveelheid specimen beschikbaar was voor een test met de NGS-vergelijkingsassay. Van deze 453 klinische specimens voldeden er 385 aan de specimenvereisten van de NGS-vergelijking wat betreft weefselvolume en tumorgehalte en leverden 379 specimens een geldig resultaat voor NGS.

Monsters met geldige resultaten voor zowel NGS als de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit werden geanalyseerd met NGS als referentie ter beoordeling van het percentage positieve overeenstemming (positive percent agreement, PPA), het percentage negatieve overeenstemming (negative percent agreement, NPA) en het percentage totale overeenstemming (overall percent agreement, OPA). U vindt een overzicht van deze percentages en de bijbehorende tweezijdige 95%-betrouwbaarheidsintervallen (BI), berekend volgens Clopper-Pearson (exact), in Tabel 13.

Tabel 13. Analyse van overeenstemming voor FFPE-weefselspecimens

Meting	Percentage overeenstemming (N)	Tweezijdig 95% BI
Percentage positieve overeenstemming	99,0 (197/199)	96,4, 99,9
Percentage negatieve overeenstemming	90,0 (162/180)	84,7, 94,0
Totaal percentage overeenstemming	94,7 (359/379)	92,0, 96,7

Van de 20 tegenstrijdige resultaten voor de algehele mutatiestatus waren er twee monsters met negatieve resultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en NGS-positieve resultaten. Er waren 18 monsters met positieve resultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en NGS-negatieve resultaten. De twee monsters met negatieve resultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en NGS-positieve resultaten, werden beide door de NGS

gedetecteerd op MAF-niveaus onder de LoD van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Van de 18 monsters die positief werden beoordeeld met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en negatief met NGS waren er 11 laag-positief (binnen één  $\Delta C_T$  van de limiet met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en dus laag-positieve monsters). Er werd één geval gedetecteerd als H1047L (3140A>T) met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, maar gedetecteerd als H1047I (3139\_3140CA>AT) met de NGS-assay. De achterliggende oorzaak van de overige zes tegenstrijdige resultaten is niet geïdentificeerd.

Tabel 14 toont de PPA van de target met NGS als de orthogonale methode.

Tabel 14. Analyse van overeenstemming voor FFPE-weefselspecimens per specifieke mutatie

Mutatie*	Percentage positieve overeenstemming (N)	Tweezijdig 95% BI
C420R	100,0 (4/4)	39,8, 100,0
E542K	100,0 (27/27)	87,2, 100,0
E545G	100,0 (3/3)	29,2, 100,0
E545K	100,0 (49/49)	92,7, 100,0
E545A	100,0 (2/2)	15,8, 100,0
Q546E	100,0 (1/1)	2,5, 100,0
Q546R	50,0 (1/2)	1,3, 98,7
H1047L	100,0 (12/12)	73,5, 100,0
H1047R	98,1 (101/103)	93,2, 99,8

\* Alle 11 *PIK3CA*-mutaties werden gedetecteerd in weefselspecimen in het SOLAR-1 onderzoek (Tabel 15).

---

## Klinische prestaties: weefselspecimens

De *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is bedoeld voor gebruik als begeleidende diagnostische test, ter ondersteuning van klinici bij de identificatie van patiënten met borstkanker die in aanmerking kunnen komen voor behandeling met PIQRAY (alpelisib) op basis van de aanwezigheid van een of meer *PIK3CA*-mutaties zoals gedetecteerd in klinische FFPE-specimens van borsttumorweefsel.

### Klinische uitkomstgegevens

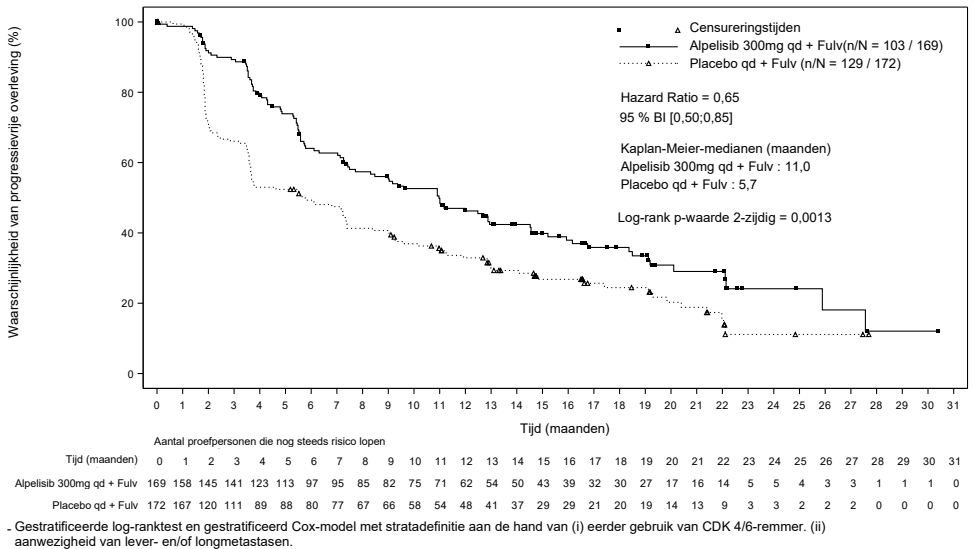
Het SOLAR-1 onderzoek, CBYL719C2301, was een gerandomiseerd, dubbelblind, placebogecontroleerd, internationaal, fase III klinisch multicenter-onderzoek naar de werkzaamheid en veiligheid van behandeling met PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant versus een placebo plus fulvestrant bij mannen en postmenopauzale vrouwen met HR+, HER2-negatieve geavanceerde borstkanker die voortschreed tijdens of na behandeling met aromataseremmers. Er waren in totaal 572 borstkankerpatiënten ingeschreven in twee cohorten, met of zonder een *PIK3CA*-mutatie. Patiënten werden gerandomiseerd en kregen PIQRAY (alpelisib) 300 mg plus fulvestrant of een placebo plus fulvestrant in een verhouding van 1:1. De randomisatie werd gestratificeerd door aanwezigheid van long- en/of levermetastase en eerdere behandeling met CDK4/6-remmer(s).

Het primaire eindpunt voor het onderzoek was progressievrije overleving (progression-free survival, PFS) aan de hand van criteria voor responseevaluatie in solide tumoren (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST v1.1), op basis van een beoordeling door de onderzoeker van deelnemende patiënten met geavanceerde borstkanker met een *PIK3CA*-mutatie. Overige secundaire eindpunten betroffen PFS voor patiënten zonder *PIK3CA*-mutatie, evenals de totale overleving (overall survival, OS), totale mate van respons (overall response rate, ORR) en mate van klinisch voordeel (clinical benefit rate, CBR) per *PIK3CA*-cohort (d.w.z. met of zonder *PIK3CA*-mutatie).

De *PIK3CA*-mutatiestatus voor de screening en deelname van patiënten werd centraal bepaald aan de hand van een Clinical Trial Assay (CTA) of de QIAGEN *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, waarbij FFPE-tumorspecimens met borstkanker werden getest. Van de 572 patiënten die waren gerandomiseerd in SOLAR-1 werden 177 patiënten (30,9% van de

onderzoekspopulatie, met inbegrip van 172 *PIK3CA*-mutatiepositieve en vijf *PIK3CA*-mutatienegatieve patiënten) gerandomiseerd met gebruik van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Alle overige patiënten (395) werden gerandomiseerd met gebruik van de CTA (69,1% van de onderzoekspopulatie, met inbegrip van 169 *PIK3CA*-mutatiepositieve en 226 *PIK3CA*-mutatienegatieve patiënten).

PIQRAY (alpelisib) in combinatie met fulvestrant vertoonde superioriteit over alleen fulvestrant voor het primaire eindpunt van PFS volgens beoordeling van de onderzoeker met gebruik van RECIST 1.1 in het *PIK3CA*-mutatiecohort. Een geschatte risicoreductie van 35% in ziekteprogressie of overlijden werd waargenomen ten gunste van de arm met PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant, ten opzichte van de arm met placebo plus fulvestrant (hazard ratio [HR] = 0,65; 95% BI: 0,50, 0,85;  $p = 0,0013$ , op basis van een tweezijdige gestratificeerde log-ranktest). De mediane PFS werd verlengd met een klinisch betekenisvolle 5,3 maanden, van 5,7 maanden in de arm met placebo plus fulvestrant tot 11,0 maanden in de arm met PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant (Afbeelding 20).



Afbeelding 20. Kaplan-Meier-plot van PFS per behandeling in de gerandomiseerde patiënten met *PIK3CA*-mutatie in SOLAR-1.



Monsters van de 395 patiënten die waren gerandomiseerd met de CTA werden retrospectief opnieuw getest met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Dit leverde 389 monsters op die konden worden geëvalueerd met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (98,5%), waarbij zes patiëntmonsters niet konden worden geëvalueerd met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (Tabel 16).

Tabel 15. Prevalentie van *PIK3CA*-mutaties gedetecteerd met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit in weefselspecimens in het SOLAR-1 klinische onderzoek

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

\* Een *PIK3CA*-mutatiepositieve patiënt kan meer dan één mutatie hebben.

† COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

N = aantal *PIK3CA*-mutatiepositieve patiënten geïdentificeerd door FFPE-weefselspecimen in SOLAR-1.

Tabel 16. Dispositie van retrospectief opnieuw geteste (CTA-deelname) proefpersonen (volledige analyseset, CTA-deelname)

Resultaten met de <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	CTA-positief (N = 169)	CTA-negatief (N = 226)	Totaal (N = 395)
Valid (Geldig)	169 (100,0%)	220 (97,3%)	389 (98,5%)
Positive (Positief)	164 (97,0%)	11 (4,9%)	175 (44,3%)
Negative (Negatief)	5 (3,0%)	209 (92,5%)	214 (54,2%)
Invalid (Ongeldig)	0 (0%)	6 (2,7%)	6 (1,5%)

Om de overeenstemming tussen de CTA en de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit te evalueren, werden de concordantie-indices PPA, NPA en OPA berekend, samen met de respectieve tweezijdige Clopper-Pearson (exact) 95%-betrouwbaarheidsintervallen.

Tabel 17 toont de evalueerbare subset van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit met de CTA als referentie en geeft een hoge mate van overeenstemming aan tussen de CTA-resultaten en de resultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

Tabel 18 gebruikt de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit als referentie en geeft een hoge mate van overeenstemming aan tussen de CTA-resultaten en de resultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

Tabel 17. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit versus CTA (met CTA als referentie)

Mate van overeenstemming	Percentage overeenstemming, %	Tweezijdig 95% BI
Percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA)	97,0	93,2, 99,0
Percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA)	95,0	91,2, 97,5
Totaal percentage overeenstemming (Overall Percent Agreement, OPA)	95,9	93,4, 97,6

Tabel 18. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit versus CTA (met *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit als referentie)

Mate van overeenstemming	Percentage overeenstemming, %	Tweezijdig 95% BI
Percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA)	93,7	89,0, 96,8
Percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA)	97,7	94,6, 99,2
Totaal percentage overeenstemming (Overall Percent Agreement, OPA)	95,9	93,4, 97,6

Tabel 19 toont de geschatte PPA, NPA en OPA, opnieuw berekend ter aanpassing voor verrijking als gevolg van de zes ontbrekende resultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit in de mutatienegatieve patiënten met CTA.

Tabel 19. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit versus CTA (met *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit als referentie)

Mate van overeenstemming	Percentage overeenstemming, %	Tweezijdig 95% BI
Percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA)	93,6	90,1, 97,0
Percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA)	97,7	95,6, 99,5
Totaal percentage overeenstemming (Overall Percent Agreement, OPA)	95,9	93,8, 97,8

De primaire PFS-analyse voor klinische bruikbaarheid van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit vertoonde een vergelijkbare klinische werkzaamheid als die vastgesteld in het SOLAR-1 onderzoek. Analyse van de subset met mutatiepositieve patiënten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (347 patiënten) toonde aan dat patiënten die waren gerandomiseerd in de arm met PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant naar schatting een 36% kleinere kans liepen op ziekteprogressie of overlijden (HR = 0,64; 95% BI: 0,48, 0,85) dan patiënten die waren gerandomiseerd in de arm met placebo plus fulvestrant.

Gevoeligheidsanalyses beoordeelden de impact van de ontbrekende gegevens met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit op PFS en toonden aan dat de resultaten robuust waren ten opzichte van ontbrekende gegevens. Wanneer er bijvoorbeeld wordt aangenomen dat de zes ontbrekende resultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit tegenstrijdig waren met de CTA-resultaten, hadden de mutatiepositieve patiënten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit die waren gerandomiseerd in de arm met PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant naar schatting een 37% kleinere kans liepen op ziekteprogressie of overlijden (HR = 0,63; 95% BI [0,47, 0,84]) dan patiënten die waren gerandomiseerd in de arm met placebo plus fulvestrant.

Alle mutatiepositieve patiënten met CTA-deelname konden worden geëvalueerd met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en slechts zes mutatienegatieve patiënten met CTA-deelname konden niet worden geëvalueerd met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Als gevolg was er geen vertekening in de resultaten door de evalueerbaarheid van onderzoeksmonsters.

De PFS werd ook geschat in de populatie die negatief was met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en bij die patiënten werd geen PFS-voordeel geobserveerd (HR = 0,85; 95% BI: 0,58, 1,25).

---

# Prestatiekenmerken: plasmaspecimens

## Analyseprestaties: plasmaspecimens

De specifieke prestatiekenmerken van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit zijn vastgesteld door middel van onderzoeken met klinische plasmaspecimens afgenomen bij borstkankerpatiënten, kunstmatige plasmaspecimens met plasma van gezonde donoren (healthy donor, HD) plasma waaraan gefragmenteerd cellijn-DNA is toegevoegd van 11 menselijke cellijnspecimens die bekende *PIK3CA*-mutaties bevatten die door de assay worden gedetecteerd en één wild-type *PIK3CA*-cellijnspecimen (d.w.z. geen claim van mutatedetectie door de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit in exon 7, 9 en 20).

## Blancolimiet (Limit of Blank, LoB): plasmaspecimens

De blancolimiet (Limit Of Blank, LoB) wordt in CLSI-richtlijn EP17-A2 gedefinieerd als "het hoogste meetresultaat dat waarschijnlijk wordt geobserveerd (met een vermelde waarschijnlijkheid) voor een blanco monster". Voor de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit is dit het gegevenspunt dat overeenkomt met het bovenpercentiel van 95% in de blanco monsters. Om de prestaties van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit te beoordelen bij afwezigheid van een template, en om te garanderen dat een monster met wild-type DNA niet een analytisch signaal genereert dat een lage concentratie mutatie kan aanduiden, werden er in totaal 60 unieke HD-specimens, waaraan serieel verdund, gefragmenteerd wild-type *PIK3CA*-DNA bij zes uitgangsniveaus was toegevoegd, in drievoud getest in een onderzoek volgens CLSI-richtlijn EP17-A2 om de LoB vast te stellen voor elke mutatie-assay. Alle mutatie-assays leverden LoB-waarden op boven de limiet voor de betreffende mutaties. De LoB van de *PIK3CA*-mutanten zoals gedetecteerd met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit in plasmaspecimens wordt hieronder getoond (Tabel 20).

Tabel 20. Overzicht van LoB-resultaten

Exon	Mutatie	Baseverandering	LoB ( $\Delta C_T$ -waarde)	Foutpositief resultaatpercentage (%)
7	C420R	1258T>C	11,15	0%
9	E542K	1624G>A	8,32	0%
	E545A	1634A>C	15,82	0%
	E545D	1635G>T	9,13	0%
	E545G	1634A>G	13,39	0%
	E545K	1633G>A	15,74	0%
	Q546E	1636C>G	15,82	0%
	Q546R	1637A>G	10,19	0,56%
	H1047L	3140A>T	15,55	0,56%
20	H1047R	3140A>G	11,93	0%
	H1047Y	3139C>T	9,89	0%

## Detectielimiet (Limit of Detection, LoD): plasmaspecimens

Er werd een onderzoek uitgevoerd om de LoD voor elk van de 11 *PIK3CA*-mutaties vast te stellen met behulp van kunstmatige plasmaspecimens. De LoD werd gedefinieerd als de kleinste hoeveelheid mutant DNA tegen een achtergrond van wild-type DNA waarbij een monster met mutaties een mutatiepositief resultaat oplevert bij 95% van de testresultaten ( $C_{95}$ ).

Om de LoD voor elke mutatie te bepalen, werden monsters met verschillende mutatiepercentages bereid met een lage uitgangskoncentratie DNA. Deze werden vervolgens getest met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (Tabel 21). Voor elke assay werd de LoD berekend met behulp van een probitmethode. De LoD van 11 kunstmatige mutatiemonsters werd vastgesteld aan de hand van drie verschillende partijen van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, waarbij 24 replica's werden getest per kitpartij per niveau. Een subset van de mutaties werd geverifieerd aan de hand van klinische plasmamonsters op de vastgestelde LoD.

Tabel 21. LoD voor plasmaspecimens zoals vastgesteld met klinische en kunstmatige plasmaspecimens met lage ingangconcentratie DNA

Exon	Mutatie	ID-nummer COSMIC*	Baseverandering	LoD, % MAF
7	C420R	757	1258T>C	4,46 <sup>†</sup>
9	E542K	760	1624G>A	5,06 <sup>††</sup>
	E545A	12458	1634A>C	1,82 <sup>†</sup>
	E545D	765	1635G>T	3,21 <sup>†</sup>
	E545G	764	1634A>G	1,94 <sup>††</sup>
	E545K	763	1633G>A	2,42 <sup>††</sup>
	Q546E	6147	1636C>G	5,31 <sup>†</sup>
	Q546R	12459	1637A>G	4,22 <sup>†</sup>
20	H1047L	776	3140A>T	2,37 <sup>††</sup>
	H1047R	775	3140A>G	1,98 <sup>††</sup>
	H1047Y	774	3139C>T	7,07 <sup>†</sup>

MAF: Mutant-allelfrequentie.

\* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

<sup>†</sup> LoD-waarden werden vastgesteld op basis van cellijnspecimens.

<sup>††</sup> LoD-waarden werden vastgesteld op basis van klinische plasmaspecimens.

## Uitgangsbereik genomisch DNA: plasmaspecimens

Het werkbereik van controle- $C_T$ -waarden werd vastgesteld aan de hand van berekende tolerantie-intervallen en LoB-waarden. Het  $C_T$ -werkbereik van de controle-assay werd vastgesteld aan de hand van in totaal 30 afzonderlijke wild-type monsters van 10 ml met verschillende concentraties wild-type DNA (120 observaties). Het definitieve  $C_T$ -werkbereik van de controle-assay werd ingesteld op een  $C_T$ -waarde van 24,69 tot 31,68. Dit leverde een 98%-betrouwbaarheidsniveau op voor 95% van de beoogde gebruikspopulatie.

## $\Delta C_T$ -limietwaarden: plasmaspecimens

Er werden kunstmatige plasmaspecimens gebruikt om voor elke mutatie de limietwaarde vast te stellen. Naast statistische analyse van  $\Delta C_T$ -waarden werden LoB-waarden en ontwerpvereisten voor de percentages foutpositieven en foutnegatieven gebruikt om aanvaardbare limietwaarden te definiëren.

De vastgestelde limietwaarden worden getoond in Tabel 22.

Tabel 22. Vastgestelde limietwaarden voor elke mutatie-assay bij het testen van DNA uit plasmaspecimens

Assay	Limietwaarde ( $\Delta C_T$ )
C420R	$\leq 6,0$
E542K	$\leq 4,8$
E545A	$\leq 10,0$
E545D	$\leq 7,0$
E545G	$\leq 9,5$
E545K	$\leq 10,0$
Q546E	$\leq 10,0$
Q546R	$\leq 7,0$
H1047L	$\leq 10,0$
H1047R	$\leq 9,0$
H1047Y	$\leq 6,2$

---

## Effect van DNA in het uitgangsmateriaal op de $\Delta C_T$ -waarden (lineariteit): plasmaspecimens

De uitgangskoncentratie DNA wordt gedefinieerd als de totale hoeveelheid amplificeerbaar DNA in een monster, zoals vastgesteld op basis van de  $C_T$ -waarden van de *PIK3CA*-controlereactie. Om aan te tonen dat de prestaties van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit consistent zijn in het gehele  $C_T$ -bereik voor de controlereactie (24,69 tot 31,68), werd een seriële verdunning met 8 niveaus voor elk van de 11 *PIK3CA*-mutatie-assays voorbereid (gefragmenteerd DNA geëxtraheerd uit cellijnspecimens). De  $C_T$ -doelwaarden voor verdunningsniveaus 1 en 8 waren voor elke mutatie bedoeld om boven en onder het  $C_T$ -bereik voor de controlereactie te vallen. In het algemeen waren de  $\Delta C_T$ -waarden bij verschillende uitgangskoncentraties DNA consistent over het volledige werkbereik van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit voor mutaties.

## Assayspecificiteit (kruisreactiviteit/specificiteit): plasmaspecimens

Om te beoordelen of kruisreactiviteit tussen mutaties die zijn gedetecteerd door de assay correct is verwerkt in de instelling van de analytische limietwaarden, zijn mutantpositieve kunstmatige plasmaspecimens, met hoge en lage uitgangskoncentraties DNA, verdund tot hoge en lage MAF-doelwaarden en in tweevoud getest met gebruik van drie partijen van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Er werd kruisreactiviteit geobserveerd tussen de assays H1047L en H1047R. Er werd echter vastgesteld dat deze kruisreactiviteit in één richting verloopt (dus als er een dubbel H1047R- en H1047L-monster wordt gezien, wordt dit alleen gemeld als "H1047R Mutation Detected" (H1047R-mutatie gedetecteerd)). Deze regel is opgenomen in het automatische algoritme van het "*therascreen*\_PIK3CA\_Plasma Assay Profile".



---

## Verstoring: plasmaspecimens

### Endogene stoffen

Mogelijke endogene interfererende stoffen die aanwezig kunnen zijn in de plasmaspecimens, werden getest in kunstmatige mutant- en wild-type monsters bij concentraties op basis van de CLSI-richtlijn EP7-A2:

- Hemoglobine (2 g/l)
- Triglyceriden (37 mmol/l)
- EDTA (3,4 µmol/l)
- Cafeïne (308 µmol/l)
- Albumine (30 mg/ml)
- Geconjugeerde bilirubine (342 µmol/l)
- Ongeconjugeerde bilirubine (342 µmol/l)

Uit de resultaten bleek dat deze stoffen niet interfereerden met de resultaten van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

### Exogene stoffen

Mogelijke exogene interfererende stoffen die aanwezig zijn tijdens het DNA-extractieproces werden getest in mutant- en wild-type monsters bij concentraties die uitgaan van 10% carry-over uit het extractieproces:

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

Uit de resultaten bleek dat deze stoffen niet interfereerden met de resultaten van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

---

## Uitwisselbaarheid van partijen: plasmaspecimens

Het *therascreen* PIK3CA RGQ PCR-systeem maakt gebruik van de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit voor extractie van DNA en van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit voor de amplificatie van DNA en detectie van de *PIK3CA*-mutatiestatus. De reproduceerbaarheid en uitwisselbaarheid tussen partijen werden aangetoond met drie partijen van de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit en één partij van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Het totale percentage correcte resultaten tussen partijen was 100% voor alle mutatiepositieve en wild-type monsters.

## Hanteren van specimens: plasmaspecimens

Om aan te tonen dat verschillende laboratoria aanvaardbare resultaten zullen voortbrengen wanneer wordt gestart met hetzelfde plasmaspecimen, werden op drie verschillende locaties extracties uitgevoerd. Kunstmatige specimens werden gebruikt voor alle 11 mutaties, evenals een klinisch wild-type *PIK3CA*-plasmaspecimen. Er werden van elk specimen 18 aliquots van 2 ml voorbereid. Deze aliquots werden gerandomiseerd en verdeeld over 18 extractiesets. Deze extractiesets werden vervolgens gelijkmatig verdeeld over de drie testlocaties (één locatie van QIAGEN in het Verenigd Koninkrijk en twee aanvullende externe locaties in de Verenigde Staten); zes extracten per onderzoekslocatie. Het testen van het DNA afkomstig uit de specimenaliquots met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit werd uitgevoerd op de locatie van QIAGEN. Bij de vergelijking van de resultaten van alle specimens op alle drie de locaties was het percentage correcte mutatiere resultaten voor *PIK3CA*-mutatiepositieve en wild-type specimens 100%.

---

## Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid: plasmaspecimens

De herhaalbaarheid van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit werd onderzocht door DNA afkomstig uit cellijnspecimens te testen. Hierbij worden alle 11 mutaties vertegenwoordigd die worden gedetecteerd met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bij 1x LoD en 3x LoD.

De herhaalbaarheid werd beoordeeld door deze monsters op één locatie en op 20 niet-opervolgende dagen te testen, met gebruik van drie Rotor-Gene Q-instrumenten en door drie laboranten om in totaal 120 replica's per monster te genereren (Tabel 23).

Tabel 23. Herhaalbaarheid van assay – proportie van correcte resultaten voor *PIK3CA*-mutaties getest in DNA-monsters uit plasmaspecimens

Exon	Mutatie	Mutatieniveau	Fractionele proportie van geldige resultaten	Correcte resultaten, %	Ondergrens tweezijdig 95% BI
n.v.t.	Wildtype	C <sub>T</sub> 30	114/120	95,00	89,43
7	C420R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
9	E542K	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E542A	LoD	119/120	99,17	95,44
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545D	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545G	LoD	119/120	99,17	95,44
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545K	LoD*	111/120	92,50	86,24
		3x LoD*	120/120	100,00	96,97
	Q546E	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
Q546R	LoD*	115/120	95,83	90,54	
	3x LoD*	120/120	100,00	96,97	
20	H1047L	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047R	LoD	110/120	91,67	85,21
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047Y	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97

\* Voor E545K en H1047R was de gebruikte LoD respectievelijk 1,99 en 1,44. De LoD werd in een volgend onderzoek bijgesteld en bevestigd. De bijgestelde LoD werd in het volgende onderzoek gebruikt (Tabel 24).

---

De reproduceerbaarheid werd gemeten door kunstmatige monsters te testen bij 1x LoD en 3x LoD op drie verschillende locaties (één locatie van QIAGEN in het Verenigd Koninkrijk en twee aanvullende externe locaties in de Verenigde Staten). Al deze monsters werden op elke locatie op 10 niet-opereenvolgende dagen getest, met gebruik van drie Rotor-Gene Q-instrumenten en door drie laboranten om in totaal 60 replica's per monster te genereren (Tabel 24).

Tabel 24. Reproduceerbaarheid van assay – proportie van correcte resultaten voor *PIK3CA*-mutaties getest in DNA-monsters uit plasmaspecimens op alle locaties

Exon	Mutatie	Mutatieniveau	Fractionele proportie van geldig resultaat	Correcte resultaten, %	Ondergrens tweezijdig 95% BI
n.v.t.	WT	C <sub>r</sub> 30	223/238	93,70	89,82
7	C420R	LoD	237/238	99,58	97,68
		3x LoD	238/238	100,00	98,46
9	E542K	LoD	237/240	98,75	96,39
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545A	LoD	239/240	99,58	97,70
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545D	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545G	LoD	237/240	98,75	96,39
		3x LoD	239/239	100,00	98,47
	E545K	LoD*	432/432	100,00	99,15
		3x LoD	240/240	100,00	89,47
	Q546E	LoD	238/238	100,00	98,46
		3x LoD	238/238	100,00	98,46
Q546R	LoD*	232/240	96,67	93,54	
	3x LoD	240/240	100,00	98,47	
20	H1047L	LoD	236/238	99,16	97,00
		3x LoD	238/238	100,00	98,46
	H1047R	LoD	430/432	99,54	98,34
		3x LoD	236/236	100,00	98,45
	H1047Y	LoD	239/240	99,58	97,70
		3x LoD	240/240	100,00	98,47

\* Monsters op de bijgestelde LoD met E545K en H1047R (conform Tabel 21) werden gedurende zes dagen op drie locaties geëvalueerd, door drie laboranten met twee runs en vier replica's voor in totaal 144 metingen per locatie, in totaal 432 op alle drie de locaties. Tabel 25 toont het percentage positieve overeenkomst (Positive Percent Agreement, PPA) van de target met NGS als de orthogonale methode.

De standaarddeviatie voor de variabiliteit tussen kits, tussen runs, tussen laboranten, tussen instrumenten, tussen dagen en binnen een run werden geschat met behulp van een variantieanalyse voor de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid. Over alle variantiecomponenten genomen bedroeg de totale standaarddeviatie (SD)  $\leq 1,34 \Delta C_T$  voor LoD en  $\leq 0,73 \Delta C_T$  voor  $3x$  LoD voor alle *PIK3CA*-mutaties die werden getest in de reproduceerbaarheidstest. Over alle panel-onderdelen met mutaties bedroeg de SD  $\leq 0,20 \Delta C_T$  voor LoD en  $\leq 0,10 \Delta C_T$  voor  $3x$  LoD tussen partijen (uitwisselbaarheid tussen partijen). De SD voor de variabiliteit binnen een run (herhaalbaarheid/precisie) liep uiteen van  $0,415 \Delta C_T$  tot  $1,407 \Delta C_T$  voor LoD en van  $0,206 \Delta C_T$  tot  $0,583 \Delta C_T$  voor  $3x$  LoD.

## Validatie van bloedafnamebuisjes

De impact van de scheidingstijd van bloed naar plasma op de kwaliteit van het plasmaspecimen en de daaropvolgende resultaten werd vastgesteld met behulp van kunstmatige bloedmonsters voor H1047R (de meest voorkomende mutatie) en volbloedspecimens van gezonde vrijwilligers werden gebruikt als wild-type specimens. Bloedspecimens werden bij vier donoren afgenomen en verzameld in  $K_2$ EDTA-buisjes van 10 ml (acht busjes per donor). Kunstmatige bloedspecimens werden gegenereerd door na de afname gefragmenteerd cellijn-DNA met de *PIK3CA*-mutant H1047R toe te voegen aan de bloedbuisjes van twee donoren. Bloedspecimens werden gescheiden in plasma op ongeveer de tijdpunten van 1 uur, 2 uur, 3 uur en 4 uur. DNA werd met de QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit uit de plasmaspecimens geëxtraheerd en elke target werd in 16 replica's getest met de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit.

Alle geteste monsters werden op elk van de tijdpunten correct geïdentificeerd. Daarnaast werd er geen statistisch significante verschuiving in  $\Delta C_T$ -waarde geobserveerd voor het monster met de *PIK3CA*-mutant H1047R.

In dit onderzoek werd aangetoond dat er geen impact is van de scheidingstijd van bloed naar plasma als het monster binnen vier uur wordt verwerkt met de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit.

## Nauwkeurigheid: vergelijking met de analytische referentiemethode (plasma-specimens)

Om de nauwkeurigheid van de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit aan te tonen, werd een onderzoek uitgevoerd met specimens uit het SOLAR-1 klinische onderzoek ten opzichte van een gevalideerde NGS-assay. De test met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en NGS voor PIK3CA-wijzigingen werd uitgevoerd met het DNA uit 552 klinische plasma-specimens uit het SOLAR-1 klinische onderzoek.

DNA-monsters waarvoor zowel de NGS-analyse als de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit geldige resultaten opleverde (542/552 monsters), werden geanalyseerd ter beoordeling van het percentage positieve overeenstemming (positive percent agreement, PPA), het percentage negatieve overeenstemming (negative percent agreement, NPA) en het percentage totale overeenstemming (overall percent agreement, OPA). U vindt een overzicht van deze percentages en de bijbehorende tweezijdige 95%-betrouwbaarheidsintervallen (BI) in Tabel 25.

Tabel 25. Analyse van overeenstemming voor DNA-monsters uit plasma-specimens

Meting	Percentage overeenstemming (N)	Ondergrens 95% BI
Percentage positieve overeenstemming	97,39 (149/153)	93,44
Percentage negatieve overeenstemming	91,26 (355/389)	88,00
Totaal percentage overeenstemming	92,99 (504/542)	90,50

Voor de 38 tegenstrijdige resultaten bij het percentage totale overeenstemming:

- Bij vier monsters (0,7%) was het resultaat Wild-Type (Wild-type) (d.w.z. No Mutation Detected (Geen mutatie gedetecteerd)) met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, maar Mutation Detected (Mutatie gedetecteerd) met NGS.
- Bij 34 monsters (6,3%) was het resultaat Mutation Detected (Mutatie gedetecteerd) met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, maar Wild-Type (Wild-type) met NGS.
- Tabel 26 toont de PPA van de target met NGS als de orthogonale methode.



Tabel 26. Analyse van overeenstemming voor DNA-monsters uit plasmaspecimens per specifieke mutatie

Mutatie*	Percentage positieve overeenstemming (N)	Tweezijdig 95% BI
C420R	100,0% (2/2)	15,8,100,0
E542K	90,9% (20/22)	70,8, 98,9
E545G	100,0% (2/2)	15,8,100,0
E545K	100,0% (38/38)	90,7,100,0
H1047L	100,0% (5/5)	47,8,100,0
H1047R	97,6% (83/85)	91,8, 99,7

\* Er werden 6/11 *PIK3CA*-mutaties gedetecteerd per plasmaspecimen in het SOLAR-1 onderzoek (Tabel 31).

## Klinische prestaties: plasmaspecimens

De *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit is bedoeld voor gebruik als begeleidende diagnostische test, ter ondersteuning van klinici bij de identificatie van patiënten met borstkanker die in aanmerking kunnen komen voor behandeling met PIQRAY (alpelisib) op basis van de aanwezigheid van één of meer gedetecteerde *PIK3CA*-mutaties in klinische plasmaspecimens uit K<sub>2</sub>EDTA-ontstold perifeer veneus volbloed.

Klinische plasmaspecimens uit K<sub>2</sub>EDTA-ontstold perifeer veneus volbloed dat is afgenomen bij borstkankerpatiënten, die zijn gerandomiseerd in SOLAR-1 voordat werd gestart met de onderzoeksbehandeling (uitgangsniveau) werden retrospectief getest met de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit ter evaluatie van de klinische bruikbaarheid van dit specimentype voor de bepaling van de *PIK3CA*-mutatiestatus en ter evaluatie van de overeenstemming tussen weefsel- en plasmaresultaten.

### Resultaten van overeenstemmingsanalyse

De overeenstemming van de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit bij gebruik van plasmaresultaten met de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit bij gebruik van weefselresultaten wordt getoond in Tabel 27. Van de 328 weefselpositieve patiënten met de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit waren er 179 plasmapositief met de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Van de 215 weefselnegatieve patiënten met de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit waren er 209 plasmanegatief met de *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Er waren geen ongeldige plasmaresultaten.

Tabel 27. Correspondentietabel tussen weefselresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en plasmaresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit

Plasma met de <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Positief	Weefsel met de <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit		
		Negatief	Ongeldig	Totaal
Positief	179	6	1	186
Negatief	149	209	5	363
Ongeldig	0	0	0	0
Totaal	328	215	6	549

De overeenstemming (PPA, NPA en OPA) tussen de plasmaresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en de weefselresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit werd berekend aan de hand van de weefselresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit als referentie (Tabel 28). De puntschattingen van PPA, NPA en OPA waren respectievelijk 55%, 97% en 72%.

Tabel 28. Overeenstemming tussen plasmaresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en weefselresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit aan de hand van de weefselresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit als referentie

Mate van overeenstemming	Percentage overeenstemming (N)	95% BI*
Percentage positieve overeenstemming	55% (179/328)	(49,0, 60,1)
Percentage negatieve overeenstemming	97% (209/215)	(94,0, 99,0)
Totaal percentage overeenstemming	72% (388/543)	(67,5, 75,2)

\* 95% BI berekend volgens Clopper-Pearson (exact).

In een bevestigende test van de plasmamonsters met een gevalideerde NGS-testreferentiemethode is 91% van de plasmaresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bevestigd. Voor de weefselpositieve patiënten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit die plasmanegatief waren met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, zijn de plasmanegatieve resultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit in 80% van de gevallen bevestigd aan de hand van NGS. Van de zes tegenstrijdige patiënten die plasmapositief

waren met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, maar weefselnegatief met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, werd het plasmapositieve resultaat bij vijf patiënten bevestigd aan de hand van NGS.

### Analyse van progressievrije overleving (Progression-Free Survival, PFS)

PFS voor PIQRAY (alpelisib) in combinatie met fulvestrant voor de plasmapositieve populatie met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (N = 185) werd geobserveerd ten gunste van de arm met PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant in vergelijking met de arm met placebo plus fulvestrant, met een geschatte risicoreductie van 46% in ziekteprogressie of overlijden (HR = 0,54, 95% BI: 0,33, 0,88) (Tabel 29). Ter vergelijking: de PFS HR in de weefselpositieve populatie met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bedroeg 0,64 (95% BI: 0,48, 0,85) en 0,65 (95% BI: 0,50, 0,85) in de PIK3CA-mutantcohort in SOLAR-1, zoals vastgesteld door de weefselassay aan het begin van de deelname.

Tabel 29. PFS-analyse bij plasmapositieve patiënten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit

PFS (N)	HR (95% BI)
	PIQRAY 300 mg qd + fulv/placebo qd + fulv*
Plasmapositief met de <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (185)	0,54 (0,33, 0,88)

\* HR en 95% BI berekend met verrijkingsaanpassing.

De PFS HR voor de 179 patiënten die weefselpositief waren met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en plasmapositief met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bedroeg 0,53 (95% BI: 0,33, 0,84). De mediane PFS bedroeg 10,9 maanden voor de arm met PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant ten opzichte van 3,6 maanden voor de arm met het placebo plus fulvestrant (Tabel 30, Afbeelding 21).



Tabel 31. Prevalentie van *PIK3CA*-mutaties gedetecteerd met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit in plasmaspectimens in het SOLAR-1 klinische onderzoek

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

\* Een *PIK3CA*-mutatiepositieve patiënt kan meer dan één mutatie hebben.

† COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

N = aantal *PIK3CA*-mutatiepositieve patiënten geïdentificeerd met plasmaspectimen in SOLAR-1.

---

## Conclusies wat betreft veiligheid en werkzaamheid

Het klinische nauwkeurigheidsonderzoek voldeed aan de aanvaardbaarheidscriteria voor PPA wat betreft mutatiepositieve monsters en voor NPA wat betreft mutatienegatieve monsters. Dit bevestigde dat de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit met plasma nauwkeurige resultaten opleverde voor zowel biomarker-positieve als -negatieve beoogde gebruiksmoesters.

Concordantie van de plasmaresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ten opzichte van de weefselresultaten met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit voor NPA bedroeg 97%. Dit duidde op een gering risico van foutpositieven. Een foutnegatief resultaat kan verhinderen dat een mogelijk gunstig medicijn aan een patiënt wordt verstrekt. Er was een PPA van 55% voor plasma/weefsel. Dit geeft aan dat plasmanegatieve patiënten mogelijk *PIK3CA*-mutatiepositief zijn aan de hand van weefsel. Wanneer plasma van patiënten *PIK3CA*-mutatienegatieve resultaten opleverde met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, moet derhalve een weefsel specimen worden getest om de *PIK3CA*-mutatiestatus te bevestigen.

De klinische werkzaamheid van PIQRAY (alpelisib) in combinatie met fulvestrant voor de met plasma met de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit geteste *PIK3CA*-mutatiepositieve populatie, zoals geïdentificeerd door de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, werd aangetoond met een geschatte risicoreductie van 46% in ziekteprogressie of overlijden in vergelijking met placebo plus fulvestrant (HR = 0,54, 95% BI: 0,33, 0,88).

# Gids voor probleemoplossing

Deze gids voor probleemoplossing kan helpen bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg ook de pagina 'Veelgestelde vragen' in ons centrum voor technische ondersteuning voor meer informatie: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). De wetenschappers bij de technische diensten (Technical Services) van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en protocollen in dit handboek of over monster- en assaytechnologieën (zie voor contactgegevens de achterzijde van deze handleiding of ga naar [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Opmerkingen en suggesties

---

### Waarschuwingsbericht "No $C_T$ value" (Geen $C_T$ -waarde) in positieve controle (PC)

- |   |   |
|---|---|
| a) Onjuiste configuratie van de PCR   | Controleer uw pipetteerschema en herhaal de PCR.  |
| b) De bewaarcondities voor een of meer kitcomponenten voldeden niet aan de instructies die worden gegeven in "Opslag en hantering van reagentia", pagina 22 | Controleer de bewaarcondities (zie het etiket van de kit) van de reagentia en neem indien nodig een nieuwe kit. |

### Waarschuwingsbericht "Unexpected $C_T$ value" (Onverwachte $C_T$ -waarde) in NTC

Er is contaminatie opgetreden tijdens de voorbereiding van de PCR	Zorg ervoor dat het gebied is gedecontamineerd. Voer de PCR opnieuw uit met nieuwe reagentia. Sluit indien mogelijk de PCR-buisjes direct na toevoeging van het te testen monster af. Zorg ervoor dat de werkrimte en instrumenten regelmatig gedecontamineerd worden.
---	--

### Waarschuwingsbericht "Above acceptable range" (Boven aanvaardbaar bereik) of "Below acceptable range" (Onder aanvaardbaar bereik) in PC

Fout tijdens de voorbereiding van de PCR	Voer de PCR opnieuw uit en zorg voor nauwkeurige pipettering.
--	---

### Waarschuwingsbericht "DNA input too high" (Uitgangconcentratie DNA te hoog) in het monsterbuisje

Monster is te geconcentreerd	Verdun het monster voor een hogere $C_T$ -waarde. Gebruik voor het verdunnen van monsters het water voor verdunnen uit de kit (Dil.).
------------------------------	---

## Opmerkingen en suggesties

### Waarschuwingbericht "Above acceptable range" (Boven aanvaardbaar bereik) in monsterbuisje

Er is onvoldoende DNA-template in het uitgangsmateriaal van het monster aanwezig

**Weefselspecimens:** Voer de test nog een keer uit. Als hetzelfde waarschuwingbericht nogmaals wordt weergegeven, voer dan opnieuw de DNA-extractie uit met twee objectglasjes uit hetzelfde specimen van gereceerd weefsel en een passend aantal objectglasjes voor CNB's om 20 mm<sup>2</sup> te verkrijgen en herhaal de PCR. Als na de re-extractie nog steeds hetzelfde waarschuwingbericht wordt weergegeven voor het monster, voer de test dan een tweede keer uit. Als het waarschuwingbericht nogmaals wordt weergegeven, is het specimen niet geschikt voor gebruik. Het moet dan worden geregistreerd als "onbepaald" en wordt niet verder getest.

**Plasmaspecimens:** Voer de test nog een keer uit. Als hetzelfde waarschuwingbericht nogmaals wordt weergegeven, voer dan opnieuw de DNA-extractie uit met 2 ml patiëntplasma. Als na de re-extractie nog steeds hetzelfde waarschuwingbericht wordt weergegeven voor het monster, is het specimen niet geschikt voor gebruik. Het moet dan worden geregistreerd als "onbepaald" en wordt niet verder getest. Overweeg om de test te herhalen met een vers specimen bloedplasma.

### Waarschuwingbericht "IC above acceptable range" (IC boven aanvaardbaar bereik) in het monsterbuisje

Fout tijdens voorbereiding van de PCR of er is sprake van een remmer tijdens de reactie

**Weefselspecimens:** Voer de test nog een keer uit. Als hetzelfde waarschuwingbericht nogmaals wordt weergegeven, voer dan opnieuw de DNA-extractie uit met twee objectglasjes uit hetzelfde specimen van gereceerd weefsel of een passend aantal objectglasjes voor CNB's om 20 mm<sup>2</sup> te verkrijgen en herhaal de PCR. Als na de re-extractie nog steeds hetzelfde waarschuwingbericht wordt weergegeven voor het monster, voer de test dan een tweede keer uit. Als het waarschuwingbericht nogmaals wordt weergegeven, is het specimen niet geschikt voor gebruik. Het moet dan worden gerapporteerd als "onbepaald" en wordt niet verder getest.

**Plasmaspecimens:** Voer de test nog een keer uit. Als hetzelfde waarschuwingbericht nogmaals wordt weergegeven, voer dan opnieuw de DNA-extractie uit met 2 ml patiëntplasma. Als na de re-extractie nog steeds hetzelfde waarschuwingbericht wordt weergegeven voor het monster, is het specimen niet geschikt voor gebruik. Het moet dan worden geregistreerd als "onbepaald" en wordt niet verder getest. Overweeg om de test te herhalen met een vers specimen bloedplasma.

### Waarschuwingbericht "No C<sub>T</sub> value" (Geen C<sub>T</sub>-waarde) in T1-controle (monster)

Geen amplificeerbare DNA-template aanwezig in monster

**Weefselspecimens:** Voer de test nog een keer uit. Als hetzelfde waarschuwingbericht nogmaals wordt weergegeven, voer dan opnieuw de DNA-extractie uit met twee objectglasjes uit hetzelfde specimen van gereceerd weefsel of een passend aantal objectglasjes voor CNB's om 20 mm<sup>2</sup> te verkrijgen en herhaal de PCR. Als na de re-extractie nog steeds hetzelfde waarschuwingbericht wordt weergegeven voor het monster, voer de test dan een tweede keer uit. Als het waarschuwingbericht nogmaals wordt weergegeven, is het specimen niet geschikt voor gebruik. Het moet dan worden geregistreerd als "onbepaald" en wordt niet verder getest.

**Plasmaspecimens:** Voer de test nog een keer uit. Als hetzelfde waarschuwingbericht nogmaals wordt weergegeven, voer dan opnieuw de DNA-extractie uit met 2 ml patiëntplasma. Als na de re-extractie nog steeds hetzelfde waarschuwingbericht wordt weergegeven voor het monster, is het specimen niet geschikt voor gebruik. Het moet dan worden geregistreerd als "onbepaald" en wordt niet verder getest. Overweeg om de test te herhalen met een vers specimen bloedplasma.



---

## Referenties














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

## 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 ondersteuning van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Symbolen

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

Symbool	Symbooldefinitie
	Markering voor Europese regelgeving
	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer
	Componenten
	Bevat
	Nummer
	Bescherm tegen licht
	Global Trade Item Number
Rn	'R' staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing (Handleiding); 'n' is het revisienummer
	Temperatuurbeperring

Symbool

Symbooldefinitie

---



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing



Let op

# Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (24)	Voor 24 reacties: 6 reactiemengsels, positieve controle, <i>Taq</i> DNA-polymerase, water voor NTC en water voor monsterverdunning	873111
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Voor 50 DNA-bereidingen: QIAamp MinElute®-kolommen, proteïnase K, buffers, afnamebuisjes (2 ml)	60404
QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit		
QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (50)	Voor 50 DNA-bereidingen: QIAamp MinElute-kolommen, proteïnase K, buffers en bloedafnamebuisjes (2 ml)	61504
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM en accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler en High Resolution Melt-analysator met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, karmijnrood) plus HRM-kanaal, laptopcomputer, software, accessoires: met 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler en High Resolution Melt-analysator met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, karmijnrood) plus HRM-kanaal, laptopcomputer, software, accessoires: met 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9002033
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 dunwandige buisjes voor 1000 reacties van 20–50 µl	981005

Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 10.000 reacties	981106
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium blok voor handmatig opzetten van reacties met een enkelkanaals pipet in 72 buisjes van 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes	Aluminium blok voor handmatig opzetten van reacties met een enkelkanaals pipet in 96 PCR-buisjes van 0,2 ml	9018905
72-Well Rotor	Voor het vasthouden van Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, met reactievolumes van 10–50 µl; vereist Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Voor het vergrendelen van Strip Tubes and Caps, 0.1 ml in de 72-Well Rotor	9018904
QIAvac 24 Plus vacuüm manifold	Voor ctDNA-zuivering	19413
QIAvac Connecting System	Voor ctDNA-zuivering	19419
Vacuüm Pump	Voor ctDNA-zuivering; of vergelijkbare pomp die een vacuüm kan produceren van –800 tot –900 mbar	84010

Zie het handboek of de gebruiksaanwijzing van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Het handboek en de gebruiksaanwijzing van QIAGEN Kits zijn verkrijgbaar via [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) of kunnen bij de technische ondersteuning van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur worden aangevraagd.

# Revisiegeschiedenis van document

Datum	Wijzigingen
R1, juni 2019	Eerste uitgave
R2, september 2019	Correctie in frequentiekolom in Tabel 15; typografische fouten verbeterd; de layout is bijgewerkt

---

Pagina is opzettelijk leeg gelaten

---

Pagina is opzettelijk leeg gelaten



#### Beperkte licentieovereenkomst voor de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit

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

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product zijn meegeleverd en deze handleiding, en mag alleen worden gebruikt met componenten in het paneel. 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 aan 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 kan de verbodsbepalingen in deze Beperkte Licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht met betrekking tot de kit en/of de componenten ervan af te dwingen.

Mededeling voor koper: De aankoop van dit product geeft de koper het beperkte, niet-overdraagbare recht om alleen deze hoeveelheid van het product te gebruiken om het gepatenteerde proces met peptide-nucleïnezuur (Peptide Nucleic Acid, PNA) uit te voeren uitsluitend voor activiteiten die onder de aankoop vallen, zoals uiteengezet in de bijbehorende QIAGEN-gebruiksaanwijzing of bijsluit, op het gebied van menselijke diagnostiek. Door dit product te kopen, stemt de koper ermee in om niet: (1) het product in welke vorm dan ook door te verkopen; (2) het product te gebruiken voor forensische toepassingen; of (3) het product te gebruiken voor andere doeleinden dan beschreven in deze beperkte gebruikslicentie. Neem voor meer informatie over het verkrijgen van rechten die vallen onder octrooien van Applied Biosystems LLC contact op met de afdeling Licensing (Licenties), Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad CA 92008: telefoon (760) 603-7200; e-mail [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com).

Zie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) voor de bijgewerkte licentievoorwaarden en productspecifieke vrijwaringsclausules.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, *therascreen*® (QIAGEN Group); DNAzap™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.); PIQRAY® (Novartis AG). Geregistreerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, moeten altijd als wettelijk beschermd worden beschouwd, zelfs als ze niet specifiek als zodanig zijn aangegeven.

1116336 Sep-19 HB-2635-001 © 2019 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

---

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