



## Epi proLung<sup>®</sup>

Epi proLung PCR Kit (M6-02-002)

Epi proLung Control Kit (M6-02-003)

### Achtung!

Benutzen Sie bitte nur die aktuellste Version der Gebrauchsanweisung.

Überprüfen Sie unter [www.epigenomics.com](http://www.epigenomics.com) vor jedem Gebrauch des Kits, ob Sie die aktuellste Version der Gebrauchsanweisung vorliegen haben.

Lesen Sie vor dem Gebrauch des Kits diese Gebrauchsanweisung aufmerksam durch befolgen Sie diese genauestens, um zuverlässige Testergebnisse zu gewährleisten.



IFU 0018, rev 4, copyright ©, 06. August 2018, Epigenomics AG



M6-02-002, M6-02-003



Epigenomics AG  
Geneststraße 5, 10829 Berlin  
Deutschland

## Contents

<b>1.0</b>	<b>Name und Verwendungszweck</b> .....	<b>2</b>
<b>2.0</b>	<b>Zusammenfassung und Erläuterung des Testverfahrens</b> .....	<b>2</b>
<b>3.0</b>	<b>Technologische Verfahrensgrundlagen</b> .....	<b>3</b>
<b>4.0</b>	<b>Kit-Zusammensetzung</b> .....	<b>3</b>
<b>5.0</b>	<b>Lagerung und Stabilität</b> .....	<b>4</b>
<b>6.0</b>	<b>Benötigte, aber nicht mitgelieferte Instrumente, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien</b> .....	<b>4</b>
<b>7.0</b>	<b>Vorsichtsmaßnahmen</b> .....	<b>6</b>
<b>8.0</b>	<b>Probenentnahme und Probenprozessierung</b> .....	<b>7</b>
<b>9.0</b>	<b>Testverfahren</b> .....	<b>8</b>
9.1	DNA Extraktion und Bisulfit-Konvertierung mit dem Epi BiSKit (M7-01-001).....	8
9.2	Vorbereitung der PCR.....	15
<b>10.0</b>	<b>Analyse</b> .....	<b>16</b>
10.1	Softwareanforderungen.....	16
10.2	Vorbereitung der PCR Platte .....	16
10.3	Starten der PCR Platte .....	17
10.4	Ergebnisanalyse .....	20
10.5	Validität der Epi proLung Kontrollen.....	20
<b>11.0</b>	<b>Ergebnisinterpretation und der EPLT-Wert</b> .....	<b>21</b>
11.1	Validität einer Patienten Probe mittels des internen Kontroll-Assays.....	21
11.2	EPLT-Wert Berechnung.....	21
<b>12.0</b>	<b>Qualitätskontrolle</b> .....	<b>22</b>
<b>13.0</b>	<b>Grenzen des Verfahrens</b> .....	<b>22</b>
<b>14.0</b>	<b>Spezifische Leistungsdaten</b> .....	<b>23</b>
<b>15.0</b>	<b>Glossar</b> .....	<b>27</b>
<b>16.0</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>28</b>
<b>17.0</b>	<b>Kontaktinformationen</b> .....	<b>28</b>

### 1.0 Name und Verwendungszweck

Epi proLung ist ein Test zum Nachweis von methylierten DNA-Biomarkern (SHOX2 und PTGER4) in bisulfit-konvertierter DNA (bisDNA) mittels real-time PCR aus humanen Plasmaproben. Epi proLung dient zur Unterstützung bei der Diagnosestellung von Lungenkrebs bei Risikopatienten. Zu den Risikofaktoren für Lungenkrebs zählen unter anderem Lebensstil, und/oder entsprechende Symptome, die auf eine Lungenkrebskrankung hinweisen und/oder radiologische Auffälligkeiten der Lunge.

Epi proLung besteht aus dem Epi proLung PCR Kit (M6-02-002) und dem Epi proLung Control Kit (M6-02-003) und wurde mit bisDNA, die unter der Verwendung des Epi BiSKit (M7-01-001) hergestellt wurde, validiert.

### 2.0 Zusammenfassung und Erläuterung des Testverfahrens

Epi proLung ist ein Test für den qualitativen Nachweis von methylierter SHOX2 und PTGER4 DNA in 3,5 ml Patientenplasma. Der Test basiert auf dem spezifischen Nachweis methylierter SHOX2 und PTGER4 DNA durch die Amplifikation dieser Biomarker mittels real-time PCR aus frei-zirkulierender DNA im Plasma und somit Blut. Die Bestimmung der SHOX2 und PTGER4 Methylierung im Blut ermöglicht eine Erkennung von Lungenkrebs und dessen Unterscheidung von benignen Lungenerkrankungen<sup>1</sup>.

### 3.0 Technologische Verfahrensgrundlagen

Für den Epi proLung Test wird bisulfit-konvertierte DNA (bisDNA) benötigt, die mittels des Epi BiSKit (M7-01-001) von Epigenomics extrahiert, bisulfit-konvertiert und aufgereinigt wurde. Bei dem Testverfahren des Epi proLung PCR Kits handelt es sich um eine Triplex-PCR, die die beiden Biomarker SHOX2 und PTGER4 sowie ACTB ( $\beta$ -Aktin) als interne Kontrolle detektiert. Mittels der internen Kontrolle wird sichergestellt, dass die Menge an Gesamt-DNA in der Probe ausreichend ist. Die Positiv- und Negativ-Kontrollen des Epi proLung Control Kits sind des Weiteren für jeden Lauf erforderlich und werden beginnend mit der DNA Extraktion prozessiert.

Die mittels des Epi BiSKits (M7-01-001) durchgeführte Gewinnung von Patienten-DNA aus Plasma basiert auf der Bindung der frei-zirkulierenden DNA an Magnetpartikel, die anschließend mit Hilfe eines Magneten vom Plasma getrennt und durch diverse Waschschrte gereinigt werden. Bei der Elution wird die aufgereinigte DNA von den Magnetpartikeln im Elutionspuffer gelöst und anschließend mit Bisulfit behandelt. Dadurch werden nicht-methylierte Cytosine in der DNA spezifisch verändert. Die Bisulfitreaktion ist die Methode der Wahl, um DNA-Methylierungen zu untersuchen. Die Umwandlung basiert auf der nukleophilen Addition eines Sulfitions an ein Cytosin und einer anschließenden Desaminierungsreaktion, wobei Uracilsulfonat entsteht, während 5-Methylcytosin (methyliertes Cytosin) nicht desaminiert wird und somit unverändert bleibt.

Die komplette Durchführung der DNA Extraktion, Bisulfit-Konvertierung und Aufreinigung mittels des Epi BiSKits (M7-01-001) ist in Abschnitt 9.1 dieses Dokumentes beschrieben und es werden keine weiteren Informationen benötigt.

Die Blocker und Detektionssonden, die in einer nachfolgenden PCR eingesetzt werden, erkennen diese Basenänderungen und unterscheiden zwischen methylierten und nicht-methylierten Sequenzen. Mit dem Epi proLung Test wird die Gesamt-bisDNA einer Region des ACTB Gens und die an den CpG Positionen methylierte bisDNA einer Region des SHOX2 sowie des PTGER4 Gens nachgewiesen. Der SHOX2 und PTGER4 Anteil der Triplex-PCR besteht aus je einem Primerpaar, welches sich an CpG-Dinukleotid-freien Regionen anlagert. Spezielle Blocker erkennen spezifisch die bisulfit-konvertierten unmethylierten Sequenzen innerhalb der Regionen und blockieren deren Amplifikation, so dass die methylierten Sequenzen bevorzugt amplifiziert werden. Methylierungsspezifische SHOX2- und PTGER4-Fluoreszenzsonden detektieren ausschließlich methylierte Sequenzen, die während der PCR amplifiziert wurden<sup>2</sup>.

### 4.0 Kit-Zusammensetzung

Epi proLung besteht aus dem Epi proLung PCR Kit und dem Epi proLung Control Kit.

Tabelle 1: Komponenten des Epi proLung PCR Kits (M6-02-002)

Reagenz	Behälter	Volumen	Lagerungstemperatur
Epi proLung PCR Mix	2 Röhrchen	je 810 $\mu$ l	-25 °C bis -15 °C
Epi proLung Polymerase	1 Röhrchen	100 $\mu$ l	-25 °C bis -15 °C

Tabelle 2: Komponenten des Epi proLung Control Kits (M6-02-003)

Reagenz	Behälter	Volumen	Lagerungstemperatur
Epi proLung Positive Control	6 Röhrchen	je 3,65 ml	-25 °C bis -15 °C
Epi proLung Negative Control	6 Röhrchen	je 3,65 ml	-25 °C bis -15 °C

Die DNA-Konzentration der Kontrollen ist mittels UV-Quantifizierung auf einen internen Standard eingestellt.

### Warnhinweise

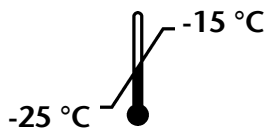
Tragen Sie beim Arbeiten mit Chemikalien immer Laborkittel sowie Einmalhandschuhe. Reinigen Sie kontaminierte Oberflächen mit Wasser. Weitere Informationen finden Sie in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (MSDS) auf unserer Webseite unter [www.epigenomics.com](http://www.epigenomics.com).

Das Epi proLung PCR Kit und das Epi proLung Control Kit enthalten keine gefährlichen oder gesundheitsschädlichen Substanzen. Bei Verwendung des Epi BiSKits (M7-01-001) gelten die in Abschnitt 9.0 („Testverfahren“) beschriebenen Warnhinweise.

## 5.0 Lagerung und Stabilität

Alle Reagenzien des Epi proLung PCR Kits und des Epi proLung Control Kits sind bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum verwendbar, wenn sie entsprechend den Anweisungen gelagert und gehandhabt werden. Verwenden Sie kein Material nach Ablauf des Verfallsdatums. Verwenden Sie keine Komponenten aus unterschiedlichen Kit Lots miteinander.

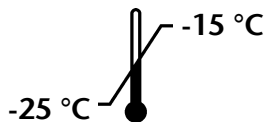
Epi proLung PCR Kit (M6-02-002)



Lagern Sie das Epi proLung PCR Mix und die Epi proLung Polymerase bei -25 bis -15 °C.

Jedes Epi proLung PCR Mix Röhrchen kann **einmal** aufgetaut und wieder eingefroren werden. Nach der erstmaligen Benutzung sind die Reagenzien bis zu 6 Wochen bei -25 bis -15 °C haltbar.

Epi proLung Control Kit (M6-02-003)



Lagern Sie das Epi proLung Control Kit bei -25 bis -15 °C.

## 6.0 Benötigte, aber nicht mitgelieferte Instrumente, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

In den folgenden Tabellen geben Auskunft über die zusätzlich benötigte Laborausstattung und deren Hersteller, um den Epi proLung Test durchzuführen. Alle Laborgeräte müssen entsprechend der Herstellerangaben installiert, kalibriert, gehandhabt und gewartet werden.

## Benötigte spezielle Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Die folgenden speziellen Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien werden für den Epi proLung Test benötigt und können nicht durch andere ersetzt werden.

<b>Spezielle Laborgeräte/Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Epi BiSKit	Epigenomics AG
Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument oder Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Instrument Beide Instrumente erfordern die Sequence Detection Software 7500 Fast System SDS v1.4 21 CFR Part 11 Module für Windows XP oder v1.4.1 21 CFR Part 11 Module für Windows 7	Thermo Fisher Scientific
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaktionsplatte mit Barcode, 0,1 ml	Thermo Fisher Scientific
MicroAmp® 96- & 384-Well Optische Abdeckfolie	Thermo Fisher Scientific
Magnet Separator: DynaMag™-15 Magnetständer	Thermo Fisher Scientific
Magnet Separator: DynaMag™-2 Magnetständer	Thermo Fisher Scientific

## Geräteanforderungen

Die Installation, Kalibrierung, Funktionsqualifizierung und Wartung des Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrumentes oder des Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Instrumentes muss entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt werden.

**Hinweis:** Eine monatliche Hintergrundkalibrierung, wie in der Gebrauchsanweisung des Herstellers für das Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR und das Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Instrument beschrieben, ist erforderlich.

Eine halbjährliche Wartung, wie in der Gebrauchsanweisung des Herstellers für das Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument und für das Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Instrument beschrieben, ist erforderlich. Diese Wartung muss die Kalibrierung der Farbstoffe FAM™, VIC™ und TEXAS RED™ beinhalten.

## Allgemeine Laborausstattung

- Reagenzglas- und Röhrchengestelle, 4-seitig, für 15 ml Röhrchen und 2 ml Röhrchen von VWR International, oder gleichwertig
- Rotationsmischer SB2 und SB3 von VWR International, oder gleichwertig
- Vortexer von VWR International, oder gleichwertig
- Eppendorf ThermoMixer® C mit Eppendorf SmartBlock™ 2,0 ml (Temperaturgenauigkeit des ThermoMixers:  $\pm 2$  °C bei 23 – 80 °C), oder gleichwertiger ThermoMixer für 2 ml Röhrchen
- Eppendorf Reference® 2, Pipette mit veränderbarem Volumen, oder gleichwertige Pipette mit veränderbarem Volumen in folgenden Bereichen: 10 - 100  $\mu$ l und 100 - 1000  $\mu$ l
- Eppendorf Multipette® M4, oder HandyStep® electronic, Brand, oder gleichwertige Pipette zur Durchführung von Dispensierserien und mit veränderbaren Volumina
- Eppendorf Zentrifuge 5418, ungekühlt, mit Rotor F-45-30-11, oder gleichwertiger Tischzentrifuge mit Rotor für 1,5/2,0 ml Röhrchen

- Eppendorf Research® plus 8-Kanal, 10 - 100 µl, oder gleichwertige Mehrkanalpipette
- Eppendorf Zentrifuge 5804 R, ungekühlt, mit Rotor A-2-DWP, oder gleichwertige Plattenzentrifuge für PCR Platten
- 100 ml Messzylinder, z.B. von Carl Roth oder 50 ml serologische Pipetten, z.B. von Fisher Scientific, oder gleichwertig

#### Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

- Absolutes Ethanol (für die Molekularbiologie,  $\geq 99.5\%$ ) von Merck KGaA, oder gleichwertig
- 15 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden, PP/steril von Sarstedt, oder gleichwertig
- Sarstedt SafeSeal 2,0 ml Reaktionsgefäße oder Eppendorf Safe-Lock™ 2,0 ml Reaktionsgefäße oder gleichwertige 2,0 ml Reaktionsgefäße mit rundem Boden und Sicherheitsdeckel (PP, frei von DNase/RNase, DNA und PCR Inhibitoren)
- ep Dualfilter T.I.P.S.®, von Eppendorf (2 – 100 µl und 50 – 1000 µl), oder gleichwertige Pipettenspitzen mit Filter
- Combitips advanced®, von Eppendorf (0,5 ml, 1 ml, 10 ml, and 25 ml), oder gleichwertige Spitzen für repetitive Pipetten für folgende Volumina: 0,5 ml, 1 ml, 10 ml, 25 ml
- Einmaltransferpipetten, nicht steril, lose, 15 cm Länge, 5 mm Halsdurchmesser, 5 ml Saugvolumen von VWR International, oder gleichwertige Einmaltransferpipetten
- Einmaltransferpipetten, nicht steril, lose, 22,5 cm Länge, 5 mm Halsdurchmesser, 5 ml Saugvolumen von Carl Roth oder gleichwertige Einmaltransferpipetten
- MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaktionsplatten mit Barcode, 0,1 ml von Thermo Fisher Scientific, oder gleichwertige 96-Well Reaktionsplatten zur DNA-Lagerung
- Adhäsiiver PCR-Film, PP, unsteril, für Temperaturen von  $-40\text{ °C}$  bis  $+120\text{ °C}$ , DNase, RNase und nucleasefrei von VWR oder Eppendorf Storage Film (self-adhesive) oder gleichwertige Klebefolien für DNA-Lagerungsplatten
- MicroAmp™ Adhesive Film Applicator von Thermo Fisher Scientific oder gleichwertiger Applikator für das Aufkleben von Klebefolien
- Wiederverschließbare Plastiktüten, 10 x 15 cm für das Entsorgen von benutzten PCR-Platten
- Nur für Lagerung von Plasma benötigt: Kryoröhrchen, 5 ml, selbststehend, RNase-, DNase-, pyrogen- und DNA-frei von VWR. oder gleichwertige Kryoröhrchen
- Blutsammelröhrchen:
  - BD Vacutainer® K2EDTA 10 ml Röhrchen, Becton Dickinson, Katalog-Nr. 367525 oder
  - S-Monovette® 9 ml K3E, Sarstedt, Katalog-Nr. 02.1066.001 oder
  - S-Monovette® 8,5 ml CPDA, Sarstedt, Katalog-Nr. 01.1610.001

## **7.0 Vorsichtsmaßnahmen**

### Vorsichtsmaßnahmen im Labor

Die Einhaltung der Regeln zur Guten Laborpraxis (Good Laboratory Practices, GLP) ist erforderlich, um während und nach der DNA-Extraktion, Bisulfitbehandlung und Reinigung das Risiko einer Kreuzkontamination von Patientenproben zu vermeiden.

Verhindern Sie während der Extraktion das Einbringen von Nukleasen in die Proben. Wir empfehlen ausschließlich Einmal-Pipetten und Einmal-Spitzen zu verwenden, um eine Kreuzkontamination zwischen Patientenproben zu vermeiden. Dieser Test sollte nur von professionellen Laboren durchgeführt werden, die mit Methoden der DNA-Extraktion und real-time PCR vertraut sind.

Um die Kontamination durch Amplifikate vorheriger PCR-Läufe zu verhindern, empfehlen wir die strikte Trennung der prä-PCR Arbeiten (z.B. DNA-Extraktion und Aufreinigung, Ansetzen der PCR-Reaktion) und post-PCR Arbeiten (z.B. real-time PCR). Außerdem empfehlen wir PCR-Platten so zu entsorgen, dass keine PCR-Produkte entweichen können. So sollten z.B. die PCR-Platten sofort nach der PCR in einer verschließbaren Plastiktüte verpackt und dann in einem dafür vorgesehenen Mülleimer entsorgt werden. Lagern Sie niemals benutzte PCR-Platten außerhalb des PCR-Instruments. Öffnen Sie niemals benutzte PCR-Platten.

### Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz vor Infektionen

Dieses Produkt enthält keine infektiösen Substanzen oder human- oder tierpathogene Erreger.

Humane Blut- und Plasmaproben, die mit diesem Test untersucht werden, sollten grundsätzlich als potentiell infektiös behandelt werden. Alle Vorsichtsmaßnahmen entsprechend der Richtlinie für mikrobiologische und biologische Sicherheit für Laboratorien, „Direktive 2000/54/EC über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit“, oder anderen Vorschriften zur biologischen Sicherheit vorgeschrieben sind, sollten deshalb eingehalten werden.

## **8.0 Probenentnahme und Probenprozessierung**

### Blutentnahme und Blutlagerung

- BD Vacutainer® K2EDTA 10 ml Röhrrchen, S-Monovette® 9 ml K3E Röhrrchen oder S-Monovette® 8,5 ml CPDA Röhrrchen entsprechend der Herstellerangaben für die Blutentnahme verwenden!
- Das Plasma sollte sofort nach der Blutentnahme von den Blutzellbestandteilen getrennt werden. Das Blut kann maximal bis zu 24 h bei 2 bis 8 °C gelagert werden, bevor das Plasma gewonnen wird. Blutproben dürfen nicht eingefroren werden!

### Plasmagewinnung und Plasmalagerung

**Hinweis:** Achten Sie darauf, dass die Schicht des Buffy Coats (Leukozytenfilm), nach dem ersten Zentrifugationsschritt oberhalb der roten Blutkörperchen bzw. nach der zweiten Zentrifugation sedimentiert auf dem Boden des Röhrrchens, nicht zerstört oder mittransferiert wird.

- Schalten Sie die Bremse Ihrer Zentrifuge aus, um eine Vermischung der Zellschichten zu vermeiden.
- Zentrifugieren Sie das Blut im Blutröhrrchen für 12 min bei  $1350 \pm 150$  rcf. Sollte die Zentrifuge Angaben in UPM (Umdrehungen pro Minute) haben, muss der entsprechende Wert in der Umrechnungstabelle der Bedienungsanleitung des Zentrifugenherstellers nachgeschlagen werden.
- Nehmen Sie das Blutröhrrchen aus der Zentrifuge.
- Benutzen Sie eine frische Einmaltransferpipette (15 cm), um das Plasma aus dem Blutröhrrchen in ein 15 ml Zentrifugenröhrrchen (PP) mit konischem Boden zu überführen.
- Zentrifugieren Sie das Plasma in dem 15 ml Zentrifugenröhrrchen 12 min bei  $1350 \pm 150$  rcf.
- Überführen Sie mit Hilfe einer frischen, extra langen Einmaltransferpipette (22,5 cm) oder serologischen Pipette 3,5 ml Plasma aus dem 15 ml Zentrifugenröhrrchen in ein beschriftetes Kryoröhrrchen oder Zentrifugenröhrrchen.
- Das Plasma kann bis zu 4 Wochen bei -25 bis -15 °C gelagert werden.
- Plasmaproben, die aus Vacutainer® K2EDTA Blut gewonnen wurden, können auch bei 2 bis 8°C bis zu 18 h gelagert werden.

## 9.0 Testverfahren

Der Epi proLung Test enthält ausreichend Reagenzien, um bis zu 32 Proben inklusive Kontrollen zu generieren. Jeweils eine Epi proLung Positive Control und eine Epi proLung Negative Control müssen in jedem Lauf enthalten sein und mit analysiert werden.

**Hinweis:** Ein kurzes Zentrifugieren von Reaktionsgefäßen (im Text als "abzentrifugieren" bezeichnet) wird in verschiedenen Schritten des Arbeitsablaufs gefordert, um Flüssigkeitstropfen vom Deckel zu entfernen und/oder die Flüssigkeit am Boden zu sammeln. Zentrifugieren Sie hierzu die Röhrchen 10 – 20 sec bei  $1.000 \pm 150$  rcf in einer Tischzentrifuge. Vermeiden Sie längeres Zentrifugieren oder Zentrifugieren bei höherer rcf, um das Verklumpen der Magnetpartikel bei bestimmten Arbeitsschritten zu verhindern.

**Hinweis:** Das Vortexen der Reaktionsgefäße gewährleistet eine homogene Mischung der Flüssigkeiten. Es wird empfohlen, den Vortexer auf mittlere Stärke einzustellen und für 5 bis 10 sec zu mischen.

### 9.1 DNA Extraktion und Bisulfit-Konvertierung mit dem Epi BiSKit (M7-01-001)

Komponenten des Epi BiSKits (M7-01-001):

Reagenz	Behälter	Volumen	Lagerungstemperatur
Lysis Binding Buffer	1 Flasche	125,0 ml	15 °C bis 30 °C
Wash A Concentrate	1 Flasche	60,0 ml	15 °C bis 30 °C
Wash B Concentrate	1 Flasche	7,0 ml	15 °C bis 30 °C
Magnetic Beads	1 Flasche	4,0 ml	15 °C bis 30 °C
Bisulfite Solution	4 Röhrchen	je 1,9 ml	15 °C bis 30 °C
Elution Buffer	1 Röhrchen	6,0 ml	15 °C bis 30 °C
Protection Buffer	1 Röhrchen	1,0 ml	15 °C bis 30 °C

**Hinweis:** Die Farbe des Protection Buffers kann von klar bis braun variieren. Die Farbe des Puffers beeinflusst nicht die Qualität des Kits.



## Warnhinweise für das Epi BiSKit (M7-01-001):

**Lysis Binding Buffer** und **Wash A Concentrate** enthalten TRITON X-100 und Guanidiniumthiocyanat

**H-Sätze/ Gefahrenhinweise:** H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H312: Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt. H318: Verursacht schwere Augenschäden. H332: Gesundheitsschädlich bei Einatmen. H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

**P-Sätze/ Sicherheitshinweise:** P261: Einatmen von Aerosol vermeiden. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P301 + P312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONEN-ZENTRUM oder Arzt anrufen. P302 + P352: BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.



DANGER

**Bisulfite Solution** enthält wässrige Ammoniumbisulfit Lösung

**H-Sätze/ Gefahrenhinweise:** H319: Verursacht schwere Augenreizung. EUH031: Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.

**P-Sätze/ Sicherheitshinweise:** P264: Nach Gebrauch Hände gründlich waschen. P271: Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden. P280: Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen. P305+351+338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P312: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONENZENTRUM oder Arzt anrufen.



WARNING

**Protection Buffer** enthält 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure, Tetrahydrofurfurylalkohol

**H-Sätze/ Gefahrenhinweise:** H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H315: Verursacht Hautreizungen. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H360Df: Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. H335: Kann die Atemwege reizen.

**P-Sätze/ Sicherheitshinweise:** P101: Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten. P102: Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P271: Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden. P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen. P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P308+P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P405: Unter Verschluss aufbewahren.



DANGER

Wash B Concentrate, Elution Buffer und Magnetic Beads des Epi BiSKits (M7-01-001) sind nicht gesundheitsschädlich.

## Lagerung des Epi BiSKits (M7-01-001):

- Lagern Sie alle Reagenzien bei 15 bis 30 °C.
- Die Bisulfite Solution ist sauerstoffempfindlich! Verwenden Sie nur ungeöffnete Röhrchen der Bisulfite Solution. Entsorgen Sie gebrauchte Lösungen! Der Kit enthält vier (4) Röhrchen der Bisulfite Solution. Daher empfehlen wir, maximal vier unabhängige Läufe durchzuführen (z.B. 4 Läufe mit jeweils 8 Proben).
- Lagern Sie die Gebrauchslösungen des Wash A Buffer und des Wash B Buffer bei 15 bis 30 °C bis zu sechs Wochen.
- Nach der erstmaligen Benutzung sind die Reagenzien bis zu sechs Wochen bei 15 bis 30 °C haltbar.

Es wird empfohlen, für wiederholtes Pipettieren folgender Reagenzien eine Dispensionspipette zu verwenden:

- Lysis Binding Buffer
- Magnetic Bead Suspension
- Ethanol in DNA Bindungsschritt 9.1.4.
- Wash A Buffer
- Wash B Buffer
- Elution Buffer
- Bisulfite Solution

- Protection Buffer und
- PCR Master Mix.

Außerdem wird dringend empfohlen, einen Rotationsmischer, der ein „Überkopf“ Mischen ermöglicht, und keinen Horizontalschüttler, zu verwenden. Es wird weiterhin empfohlen, extrahierte und bisulfit-behandelte DNA mit einer Referenzpipette zu pipettieren.

### 9.1.1 Herstellung der Arbeitslösungen

#### Herstellung des Wash A Buffers

- Geben Sie mit Hilfe eines sterilen Messzylinders oder einer serologischen Pipette 60,0 ml absolutes Ethanol (für die Molekularbiologie  $\geq 99.5\%$ ) zu dem Wash A Concentrate.
- Schließen Sie den Deckel, und mischen Sie gründlich, indem Sie die Flasche vorsichtig fünfmal invertieren. Vermeiden Sie Schaumbildung. Beschriften Sie die Flasche mit dem Datum der Verdünnung und kreuzen Sie das Kästchen "Ethanol added" an.
- Verdünnter Wash A Buffer kann bis zu sechs Wochen bei 15 bis 30 °C aufbewahrt werden.

#### Herstellung des Wash B Buffers

- Geben Sie mit Hilfe eines sterilen Messzylinders oder einer serologischen Pipette 40,0 ml absolutes Ethanol (für die Molekularbiologie,  $\geq 99.5\%$ ) zu dem Wash B Concentrate.
- Schließen Sie den Deckel, und mischen Sie gründlich, indem Sie die Flasche vorsichtig fünfmal invertieren. Beschriften Sie die Flasche mit dem Datum der Verdünnung und kreuzen Sie das Kästchen "Ethanol added" an.
- Verdünnter Wash B Buffer kann bis zu sechs Wochen bei 15 bis 30 °C aufbewahrt werden.

### 9.1.2 Auftauen von Plasma und Positive und Negative Kontrollen

- Tauen Sie jeweils eine Epi proLung Positive Control und eine Epi proLung Negative Control für 30 min bei 15 bis 30°C auf.
- Tauen Sie das gefrorene Plasma ebenfalls 30 min lang bei 15 bis 30 °C auf.
- Beginnen Sie spätestens 60 min nach dem Auftauen mit der Lyse.

### 9.1.3 Lyse

**Hinweis:** Schütteln Sie den Lysis Binding Buffer kurz vor Gebrauch, um Präzipitatsbildung auszuschließen. Sind Ablagerungen sichtbar, erwärmen Sie den Lysis Binding Buffer im Wasserbad für 60 min bei 37 °C und schwenken Sie den Puffer vorsichtig bis sich alle Präzipitate gelöst haben. Lassen Sie den Lysis Binding Buffer wieder auf Raumtemperatur abkühlen, bevor Sie fortfahren.

- Geben Sie die folgenden Reagenzien in ein beschriftetes 15 ml Zentrifugenröhrchen:
  - 3,5 ml Plasma oder Positive Control oder Negative Control
  - 3,5 ml Lysis Binding Buffer
- Schließen Sie das Röhrchen und mischen es auf dem Vortexer für 5-10 sec.
- Inkubieren Sie das Röhrchen für  $10 \pm 1$  min bei 15 bis 30 °C.

#### 9.1.4 DNA Bindung

**Hinweis:** Um eine gute DNA-Ausbeute zu gewährleisten, ist es notwendig, durch Mischen eine homogene Suspension der Magnetic Beads zu erreichen. Abweichende Bead-Mengen (zu viel oder zu wenig) können zu falschen Ergebnissen führen. Um eine homogene Suspension zu erreichen, sollte die Flasche mit den Magnetic Beads kurz vor dem Pipettieren solange sorgfältig gemischt werden, bis das Sediment am Boden der Flasche vollständig resuspendiert ist. Auch zwischen den Pipettierschritten muss immer auf eine homogene Suspension geachtet werden.

- Geben Sie die Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge in das 15 ml Zentrifugenröhrchen:
  - 90 µl Magnetic Beads (frisch resuspendiert)
  - 2,5 ml absolutes Ethanol (für die Molekularbiologie,  $\geq 99.5\%$ )
- Schließen Sie das Röhrchen und mischen es durch 5 – 6 maliges invertieren.
- Stellen Sie das 15 ml Röhrchen auf einen Rotationsmischer.
- Inkubieren Sie das Röhrchen auf dem Rotationsmischer bei Raumtemperatur für  $45 \pm 5$  min bei mittlerer Geschwindigkeit (ca. 10 – 20 UPM). Stellen Sie den Winkel des Rotationsmischers auf ca.  $35 - 45^\circ$  ein.

#### 9.1.5 Waschen der DNA

**Hinweis:** Für den späteren Gebrauch bei der Elution und bei der Bisulfit-Konvertierung stellen Sie die Temperatur des Thermoshakers auf  $80^\circ\text{C}$ , bevor Sie mit dem Waschen der DNA beginnen.

- Stellen Sie das 15 ml Zentrifugenröhrchen für 5 – 10 min in den DynaMag™-15 Magnetständer.

**Hinweis:** Falls nach diesem Schritt eine unvollständige Bindung der Magnetpartikel beobachtet wird, erhitzen Sie das betroffene Zentrifugenröhrchen für bis zu 10 min auf  $56^\circ\text{C}$  und stellen Sie anschließend das Röhrchen für 5 bis 10 min zurück in den DynaMag™-15 Magnetständer.

- Gießen Sie den Überstand vorsichtig ab. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.
  - Geben Sie 1,5 ml Wash A Buffer dazu.
- Resuspendieren Sie die Magnetpartikel vollständig durch Mischen auf dem Vortexer für 5-10 sec.
- Überführen Sie die Suspension mit den Magnetpartikeln mit Hilfe einer extra langen Einmaltransferpipette (22,5 cm) in ein beschriftetes 2,0 ml Reaktionsgefäß.
- Stellen Sie die Einmaltransferpipette zurück in das 15 ml Zentrifugenröhrchen, um restliche Magnetpartikel zu sammeln, und überführen Sie diese auch in das 2,0 ml Reaktionsgefäß.
- Stellen Sie das 2,0 ml Reaktionsgefäß für 2 – 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit einer 15 cm Einmaltransferpipette so viel Puffer wie möglich, während das 2,0 ml Reaktionsgefäß noch immer im DynaMag™-2 Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.

- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das 2,0 ml Reaktionsgefäß für 2 – 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit Hilfe einer 10 – 100 µl Referenzpipette so viel verbliebenen Puffer wie möglich, während das 2,0 ml Reaktionsgefäß noch immer im DynaMag™-2 Magnetständer steht.

#### 9.1.6 Elution

- Überführen Sie das Reaktionsgefäß in ein nicht-magnetisches Rack.
- Mischen Sie die Elution Buffer Flasche auf einem Vortexer für 5-10 sec.
- Geben Sie 100 µl Elution Buffer in jedes Reaktionsgefäß.
- Schließen Sie das Reaktionsgefäß.
- Resuspendieren Sie die Magnetpartikel durch Mischen auf dem Vortexer für 5-10 sec.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für  $10 \pm 1$  min bei  $1,000 \pm 100$  UPM und  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  in einen Thermoshaker.
- Das Reaktionsgefäß kurz abzentrifugieren.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 – 6 min in einen DynaMag™-2 Magnetständer.
- Überführen Sie das komplette Eluat (~100 µl DNA Lösung) in ein frisches 2,0 ml Reaktionsgefäß, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht.
- Verwerfen Sie das 2,0 ml Reaktionsgefäß mit den Magnetpartikeln.

#### 9.1.7 Lagerung der extrahierten DNA

**Hinweis:** Wenn Sie die extrahierte DNA nicht sofort weiterverarbeiten, können Sie die DNA bei 2 bis  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zu 24 h lagern. Extrahierte DNA **darf nicht eingefroren** werden.

#### 9.1.8 Bisulfit-Konvertierung

**Hinweis:** Die Bisulfite Solution ist sauerstoffempfindlich! Verwenden Sie daher nur ungeöffnete Röhrchen der Bisulfite Solution. Die angebrochene Lösung kann nicht gelagert werden, sondern muss sofort entsorgt werden!

- Geben Sie die folgenden Reagenzien in das 2,0 ml Reaktionsgefäß mit dem Eluat (~100 µl DNA Lösung):
  - 150 µl Bisulfite Solution
  - 25 µl Protection Buffer

**Hinweis:** Die Farbe des Protection Buffers kann von farblos bis braun variieren.

- Verschließen Sie das Reaktionsgefäß und mischen Sie die Bisulfit-Reaktionsmischung auf dem Vortexer für 5-10 sec.
- Das 2,0 ml Reaktionsgefäß kurz abzentrifugieren.
- Inkubieren Sie das Reaktionsgefäß ohne Schütteln bei  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  in einen Thermoshaker für  $45 \pm 5$  min.
- Entnehmen Sie das Reaktionsgefäß sofort nach Ablauf der Inkubationszeit von  $45 \pm 5$  min.
- Stellen Sie die Temperatur des Thermoshakers für den späteren Gebrauch auf  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  oder benutzen Sie einen zweiten Thermoshaker.

### 9.1.9 DNA-Bindung

**Hinweis:** Um eine gute Ausbeute zu gewährleisten, ist es notwendig, durch Mischen eine homogene Suspension der Magnetic Beads zu erreichen. Abweichende Bead-Mengen (zu viel oder zu wenig) können zu falschen Ergebnissen führen. Um eine homogene Suspension zu erreichen, sollte die Flasche kurz vor dem Pipettieren mit den Magnetic Beads solange sorgfältig gemischt werden, bis das Sediment am Boden der Flasche vollständig resuspendiert ist. Auch zwischen den Pipettierschritten muss immer auf eine homogene Suspension geachtet werden.

- Zentrifugieren Sie das 2,0 ml Reaktionsgefäß mit der Bisulfit-Reaktion kurz an.
- Fügen Sie die folgenden Reagenzien hinzu:
  - 1000 µl Wash A Buffer
  - 20 µl Magnetic Beads (frisch suspendiert).
- Mischen Sie mit dem Vortexer für 5-10 sec.
- Warten Sie bis der Thermoshaker 23 °C erreicht hat.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß in den Thermoshaker und inkubieren Sie bei 23 °C für  $45 \pm 5$  min bei  $1000 \pm 100$  UPM.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 – 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entnehmen Sie mit Hilfe einer frischen 15 cm Einmaltransferpipette so viel Flüssigkeit wie möglich, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.

### 9.1.10 Erster Waschschrift

- Nehmen Sie zum Waschen die Proben im Rack vom Magneten, mischen Sie auf dem Vortexer und geben Sie 800 µl Wash A Buffer hinzu.
- Mischen Sie auf dem Vortexer für 5-10 sec.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 – 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit Hilfe einer frischen 15 cm Einmaltransferpipette so viel Flüssigkeit wie möglich, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.

### 9.1.11 Zweiter Waschschrift

- Nehmen Sie zum Waschen die Proben im Rack vom Magneten, mischen Sie mit dem Vortexer und geben Sie 800 µl Wash B Buffer hinzu.
- Mischen Sie mit dem Vortexer für 5-10 sec.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 – 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit Hilfe einer frischen 15 cm Einmaltransferpipette so viel Flüssigkeit wie möglich, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.

### 9.1.12 Dritter Waschschrift

- Nehmen Sie zum Waschen die Proben im Rack vom Magneten, mischen Sie mit dem Vortexer und geben Sie folgendes Reagenz hinzu:
  - 400 µl Wash B Buffer.

- Mischen Sie mit dem Vortexer für 5-10 sec.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 – 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit Hilfe einer frischen 15 cm Einmaltransferpipette so viel Flüssigkeit wie möglich, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 – 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit Hilfe einer 10 – 100 µl Referenzpipette so viel Flüssigkeit wie möglich, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.

#### 9.1.13 Trocknen der DNA

**Hinweis:** Verlängern Sie die Trocknungszeit bzw. erhöhen Sie die Temperatur nicht. Veränderte Bedingungen können zu einer reduzierten bisDNA-Ausbeute führen!

- Inkubieren Sie das Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel in einem Thermoshaker bei 23 °C für 10 ± 1 min ohne zu schütteln.

#### 9.1.14 Elution

- Stellen Sie das Reaktionsgefäß in ein nicht-magnetisches Rack und fügen Sie 60 µl Elution Buffer hinzu.
- Schließen Sie den Deckel des Reaktionsgefäßes.
- Mischen Sie die Magnetpartikel mit dem Vortexer für 5-10 sec.
- Inkubieren Sie das Reaktionsgefäß in einem Thermoshaker bei 23 °C unter Schütteln bei 1000 ± 100 rpm für 10 ± 1 min.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 – 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Transferieren Sie das komplette Eluat (~60 µl DNA Lösung) mit einer 10 – 100 µl Referenzpipette in eine 96-Well Platte und verschließen Sie die Platte mit einer Klebefolie. Zum Verschließen verwenden Sie einen Applikator für das Aufkleben von Klebefolien.
- Für die bisDNA-Platte wird folgende Plattenbelegung empfohlen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Empfohlene Plattenbelegung für die bisDNA-Platte.

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

<sup>#</sup>Epi proLung Positive Control, <sup>§</sup>Epi proLung Negative Control

### 9.1.15 Lagerung der Bisulfit-konvertierten DNA

Sollte die Bisulfit-konvertierte DNA (bisDNA) nicht unmittelbar verwendet werden, können Sie die DNA bei 2 bis 8 °C für bis zu 24 Stunden oder bei -25 bis -15 °C für bis zu 72 Stunden lagern.

## 9.2 Vorbereitung der PCR

Jede bisDNA (Patientenprobe, Epi proLung Positive Control oder Epi proLung Negative Control) muss als Triplikat untersucht werden. Zentrifugieren Sie die Epi proLung Polymerase vor ihrer Verwendung für 10 – 20 sec bei 1.000 ± 150 rcf mit einer Tischzentrifuge, um Tropfen vom Deckel zu entfernen.

### 9.2.1 Herstellung des PCR Master Mixes

**Hinweis:** Verwenden Sie den PCR Master Mix unmittelbar nach der Herstellung, und lagern Sie diesen nicht. Nicht verwendete Epi proLung Polymerase und Epi proLung PCR Mix ist sofort nach der Benutzung wieder einzufrieren.

**Hinweis:** Für einen einzelnen PCR-Ansatz benötigen Sie 16 µl Epi proLung PCR Mix und 0,95 µl Epi proLung Polymerase. In diesem Volumen ist bereits eine ausreichende Pipettier toleranz berücksichtigt. Zur Herstellung des PCR Master Mixes muss deshalb kein zusätzliches Volumen einkalkuliert werden.

- Je nach Anzahl von Patientenproben und Kontrollproben, müssen 1 oder 2 Epi proLung PCR Mix Röhrchen aufgetaut werden (siehe Tabelle 4).
- Mischen Sie das/die Epi proLung PCR Mix Röhrchen für 5-10 sec auf dem Vortexer und zentrifugieren Sie die Röhrchen anschließend kurz an.
- Überführen Sie das entsprechende Volumen des Epi proLung PCR Mixes und der Epi proLung Polymerase wie in Tabelle 4 angegeben in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß.
- Mischen Sie den PCR Master Mix mit dem Vortexer für 5-10 sec.
- Zentrifugieren Sie den PCR Master Mix kurz an, um Tropfen vom Deckel zu entfernen.

Tabelle 4: Herstellung des PCR Master Mixes mit entsprechender Pipettiertoleranz.

Komponente	Volumen für 8 Bestimmungen (24 PCRs)	Volumen für 16 Bestimmungen (48 PCRs)	Volumen für 24 Bestimmungen (72 PCRs)	Volumen für 32 Bestimmungen (96 PCRs)
PCR Mix	384 µl	768 µl	1152 µl	1536 µl
Polymerase	22,8 µl	45,6 µl	68,4 µl	91,2 µl

Tabelle 5: Empfohlene Plattenbelegung der PCR-Platten.

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

#Epi proLung Positive Control, \$Epi proLung Negative Control

## 10.0 Analyse

### 10.1 Softwareanforderungen

Dieses Produkt wurde mit der Sequence Detection Software (SDS) 7500 Fast System SDS v1.4 21 CFR Part 11 Module (Windows XP) und SDS v1.4.1 21 CFR Part 11 Module (Windows 7) validiert.

### 10.2 Vorbereitung der PCR Platte

- Pipettieren Sie die PCR Platte entsprechend der empfohlenen Plattenbelegung (siehe Tabelle 5).
- Überführen Sie 15 µl PCR Master Mix in die entsprechenden Positionen der MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaktionsplatte.
- Wenn notwendig, zentrifugieren Sie die bisDNA Lagerplatte aus Abschnitt 9.1.14 für 1 min bei  $1.000 \pm 100$  rcf in einer Plattenzentrifuge.
- Fügen Sie 15 µl der bisDNA-Lösung in die entsprechenden Positionen der PCR-Platte.
- Verschließen Sie die PCR-Platte mit einer MicroAmp® 96-Well optischen Abdeckfolie.
- Zentrifugieren Sie die PCR-Platte mit einer Plattenzentrifuge für 1 min bei  $1.000 \pm 100$  rcf kurz an.

**Hinweis:** Starten Sie die PCR Platte sofort.



### 10.3 Starten der PCR Platte

**Hinweis:** Der PCR Master Mix enthält kein ROX oder einen anderen Referenzfarbstoff. Daher muss die passive Referenz auf "none" gesetzt werden.

**Hinweis:** Wir empfehlen, eine Templat-Datei (\*.sdt) mit den angegebenen PCR-Bedingungen abzuspeichern.

- Starten Sie die Software.
- Laden Sie die entsprechende Templat-Datei oder erstellen Sie ein neues Plattendokument.
- Klicken Sie auf "Create New Document".
- Definieren Sie die folgenden Einstellungen im Plattendokument:
  - Assay: Standard Curve (Absolute Quantification)
  - Container: 96-Well Clear
  - Template: Blank Document (oder wählen Sie die entsprechende Epi proLung Templat-Datei)
  - Run Mode: Standard 7500.
- Klicken Sie auf "Next".
- Klicken Sie auf "New Detector...".
- Erstellen Sie einen neuen Detektor mit den folgenden Einstellungen:
  - Name: SHOX2
  - Description: Epi proLung
  - Reporter dye: FAM
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Red.
- Erstellen Sie einen neuen Detektor mit den folgenden Einstellungen:
  - Name: PTGER4
  - Description: Epi proLung
  - Reporter dye: VIC
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Blue.
- Erstellen Sie einen neuen Detektor mit den folgenden Einstellungen:
  - Name: ACTB
  - Description: Epi proLung
  - Reporter dye: TEXAS RED
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Green.
- Klicken Sie "OK".
- Wählen Sie alle drei Detektoren an und klicken Sie "Add >>", um die Detektoren dem Plattendokument zuzuweisen.
- Wählen Sie "(none)" im Drop-down Menü bei "Passive Reference".
- Klicken Sie auf "Done".
- Gehen Sie auf das Menü "Setup" und "Plate".
- Wählen Sie alle 96 Wells der Platte aus.
- Gehen Sie in das Menü "View" und öffnen Sie den "Well Inspector".
- Wählen sie die Detektoren "SHOX2", "PTGER4" und "ACTB".

- Überprüfen Sie, dass die passive Referenz auf "(none)" gesetzt ist (siehe Abbildung 2).
- Klicken Sie auf "Close".
- Gehen Sie zum Menüpunkt "Instrument", um das PCR-Programm wie in Tabelle 6 beschrieben zu programmieren.
- Ändern Sie die folgenden Einstellungen:
  - Sample Volume: 30 µl,
  - Run Mode: Standard 7500,
  - Data Collection: Stage 2, Step 2.
- Erstellen Sie ein "Thermal Profile" mit drei Phasen (stages).
- Erstellen Sie "Stage 2" mit drei Schritten (steps), und "Stage 1" und "Stage 3" mit jeweils einem Schritt (step).
- Tragen Sie die Anzahl der Wiederholungen (repetitions), die Zieltemperaturen (target) und die Wartezeiten (hold) entsprechend der Angaben in Tabelle 6 ein.
- Ändern Sie die Heizrate ("Ramp Rate") entsprechend Tabelle 6.
- Stellen Sie den Wert "Data Collection" für "Stage 2, Step 2" auf "(55.5 @ 0:35)" ein.
- Überprüfen Sie die Einstellungen für das Thermal Cycler Protokoll mit den in Tabelle 6 angegebenen Werten (siehe Abbildung 1).
- Speichern Sie die Templat-Datei unter einem geeigneten Namen.
- Öffnen Sie die Ladeklappe.
- Stellen Sie die PCR-Platte in den Rahmen (die Position A1 muss sich in der oberen linken Ecke befinden) und stellen Sie sicher, dass die Platte genau in den Rahmen passt. Schließen Sie die Ladeklappe.
- Klicken Sie auf "Start", um die PCR zu starten.

Tabelle 6: Thermal Cycler Programm für Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx.

Programm Parameter	Denaturierung		Zyklen		Abkühlen
PCR Phase (stage)	"Stage 1"		"Stage 2"		"Stage 3"
Wiederholungen (repetitions)	1		45		1
Segment (step)	1	1	2	3	1
Zieltemperatur [°C] (target)	94	62	55.5	93	40
Dauer [mm:ss] (hold)	20:00	00:05	00:35	00:30	00:05
Auto Verlängerung (auto increment)		0	0	0	
Heizrate [%] (ramp rate)	40	80	80	40	80
Datenerfassung (data collection)	Stage 2, Step 2 (55.5 @ 0:35)				

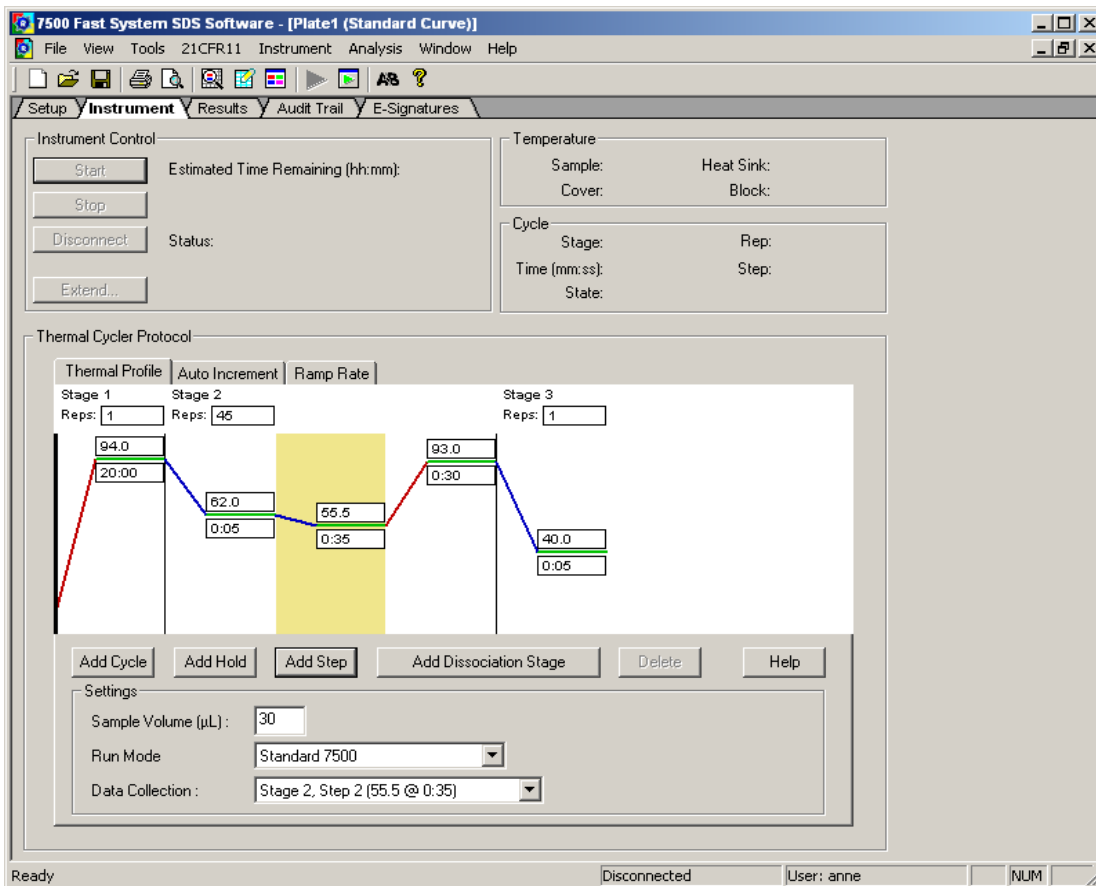


Abbildung 1: „Screenshot“ nach dem Erstellen des PCR-Programms.

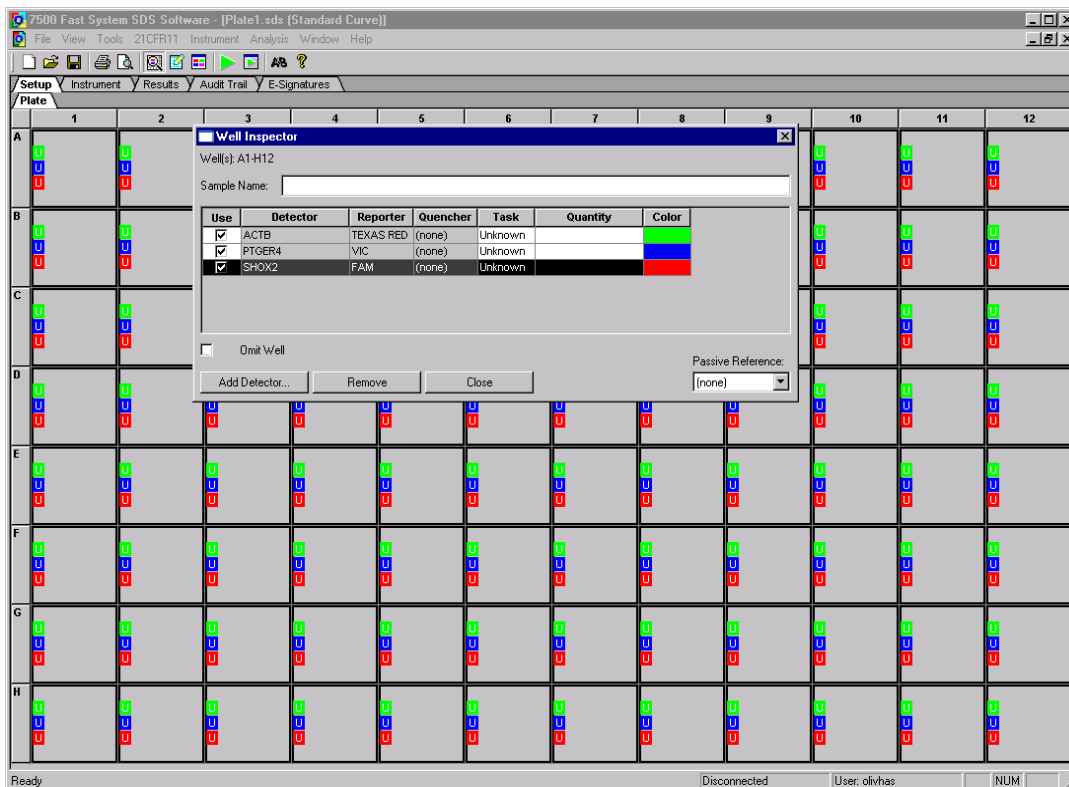


Abbildung 2: „Screenshot“ nach Bestätigung der Einstellungen im 'Well Inspector' Fenster.

## 10.4 Ergebnisanalyse

**Hinweis:** Analysieren Sie die PCR-Läufe ausschließlich mit der SDS v1.4 oder SDS v1.4.1 Software.

**Hinweis:** Unvollständige Läufe bzw. Läufe mit angezeigten Fehlermeldungen dürfen nicht analysiert werden. Der Lauf muss Fluoreszenzdaten für 45 Zyklen enthalten.

- Nach Beendigung des PCR-Laufs klicken Sie auf "OK".
- Gehen Sie in das Menü "Results" und wählen Sie den Menüpunkt "Amplification Plot".
- Definieren Sie folgende Einstellungen für den Septin 9 Detektor im Menü "Analysis Setting":
  - Data: "Delta Rn vs Cycle"
  - Detector: "All"
  - Line color: "Detector Color"
  - Manual Ct, Threshold: "25000" (erscheint als "2.5e+004")
  - Manual baseline, Start (cycle): "10"
  - Manual baseline, End (cycle): "22"
- Klicken Sie auf "Analyse".
- Klicken Sie auf "Save".
- Ct Werte für SHOX2, PTGER4 und ACTB werden automatisch berechnet.
- Wählen Sie die Positionen aus, die Sie analysieren wollen.
- Die Amplifikationskurven werden im Menü "Amplification Plot" angezeigt.
- Die Ct-Werte werden im Menü "Report" angezeigt.

**Hinweis:** Jede Amplifikationskurve sollte visuell untersucht werden. Amplifikationskurven mit widersprüchlichen Datenpunkten (noise peaks) oder linearem Kurvenverlauf sollten als negativ bewertet werden. Abbildung 3 zeigt hierzu Beispiele.

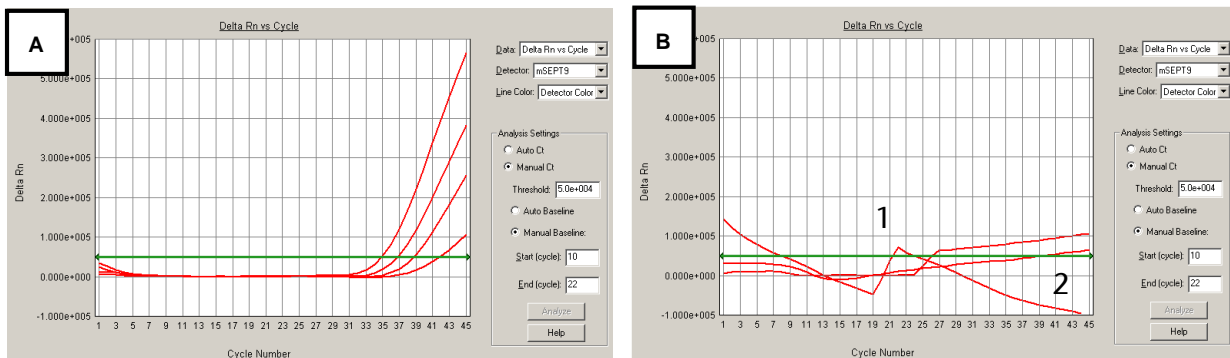


Abbildung 3: "Screenshots" von Amplifikationskurven vom Applied Biosystems 7500 Fast. A: Beispiel für valide Amplifikationskurven. B: Beispiel für negative Kurven aufgrund widersprüchlicher Datenpunkte (1) oder linearem Kurvenverlauf (2).

## 10.5 Validität der Epi proLung Kontrollen

Ein Lauf (ein oder mehrere Patientenproben, die zusammen mit einer Epi proLung Positive Control und einer Epi proLung Negative Control prozessiert wurden) ist valide, wenn die Kriterien aus Tabelle 7 für **ALLE DREI (3)** PCR-Replikate von jeder Kontrolle erfüllt sind.

Wenn entweder die Epi proLung Positive Control oder die Epi proLung Negative Control (oder beide) invalide sind, können die Patientenproben, die zusammen mit den Kontrollen prozessiert

wurden, nicht bewertet werden. Der Test muss für alle Proben in solch einem Lauf wiederholt werden.

Tabelle 7: Validitätskriterien der Epi proLung Kontrollen.

Ergebnis der Kontrolle	Bestimmung	SHOX2 Ergebnis	PTGER4 Ergebnis	ACTB Ergebnis
Valide Epi proLung Positive Control	PCR1	Ct* ≤ 39,7	Ct* ≤ 42,3	Ct* ≤ 32,0
	PCR2	Ct* ≤ 39,7	Ct* ≤ 42,3	Ct* ≤ 32,0
	PCR3	Ct* ≤ 39,7	Ct* ≤ 42,3	Ct* ≤ 32,0
Valide Epi proLung Negative Control	PCR1	kein Ct* bestimmt ("Undetermined")	kein Ct* bestimmt ("Undetermined")	Ct* ≤ 35,2
	PCR2			Ct* ≤ 35,2
	PCR3			Ct* ≤ 35,2

\*Cycle threshold (Schwellenwertzyklus)

## 11.0 Ergebnisinterpretation und der EPLT-Wert

### 11.1 Validität einer Patienten Probe mittels des internen Kontroll-Assays

Eine individuelle Patientenprobe gilt als valide, wenn der Ct-Wert des internen Kontrolltests ACTB kleiner oder gleich 33,0 für jedes der drei PCR-Replikate ist (siehe Tabelle 8). Eine Probe, die keinen Ct-Wert oder einen Ct-Wert größer als 33,0 zeigt, gilt als invalide.

Tabelle 8: Validität einer Patientenprobe.

	Bestimmung	ACTB Ergebnis
Patientenprobe valide	PCR1	Ct* ≤ 33,0
	PCR2	Ct* ≤ 33,0
	PCR3	Ct* ≤ 33,0
Patientenprobe invalide	Mindestens eine der drei PCRs	Ct* > 33,0 oder kein Ct* bestimmt

\*Cycle threshold (Schwellenwertzyklus)

### 11.2 EPLT-Wert Berechnung

**Hinweis:** Ein EPLT-Wert darf nur berechnet werden, wenn die Patienten Probe valide ist (siehe Abschnitt 11.1). Wenn die Patientenprobe invalide ist, darf kein EPLT-Wert berechnet werden.

Der EPLT-Wert wird in einem zweistufigen Verfahren berechnet:

#### 1. Ct-Wert Gruppierung:

- Bestimme den kleinsten ("minimalen") Ct-Wert der drei SHOX2 PCR Replikate → minCt.SHOX2
- Bestimme den kleinsten ("minimalen") Ct-Wert der drei PTGER4 PCR Replikate → minCt.PTGER4

**Hinweis:** Ein Ct-Wert von "45,0" wird für PCRs angenommen, für die kein Ct-Wert bestimmt wurde („undetermined“ in der SDS Software)

#### 2. Berechnung des EPLT-Werts:

- $EPLT\text{-Wert} = 13,46 - 0,14 * \text{minCt.SHOX2} - 0,23 * \text{minCt.PTGER4}$ .

Die folgende Tabelle zeigt an einem Beispiel die Berechnung des EPLT-Werts für eine Patientenprobe:

Tabelle 9: Beispiel für die EPLT-Wert Berechnung.

Ergebnisse einer Patientenprobe		
1. Ct-Wert	SHOX2 PCR1: 30,01	PTGER4 PCR1: 31,20
Gruppierung <sup>1</sup> :	SHOX2 PCR2: 29,85	PTGER4 PCR2: 31,25
	SHOX2 PCR3: 30,05	PTGER4 PCR3: 31,24
	minCt.SHOX2 = <b>29,85</b>	minCt.PTGER4 = <b>31,20</b>
2. Berechnung des EPLT-Werts:	$\begin{aligned} \text{EPLT-Wert} &= 13,46 - (0,14 * \text{minCt.SHOX2}) - (0,23 * \text{minCt.PTGER4}) \\ &= 13,46 - (0,14 * 29,85) - (0,23 * 31,20) \\ &= 13,46 - 4,18 - 7,18 \\ &= 2,10 \\ \text{EPLT-Wert} &= \mathbf{2,10} \end{aligned}$	

<sup>1</sup>Ein Ct-Wert von "45,0" wird für PCRs angenommen, für die kein Ct-Wert bestimmt wurde („undetermined“ in der SDS Software)

## 12.0 Qualitätskontrolle

### Externe Kontrollen

Epi proLung enthält Epi proLung Positive und Epi proLung Negative Control (M6-02-003). Diese Kontrollen müssen in jedem Lauf eingesetzt werden, um die erfolgreiche Durchführung des Tests zu bestätigen, und die Validität der Ergebnisse sicherzustellen. Die Epi proLung Positiv Control und Negative Control müssen innerhalb ihrer spezifizierten Validitätsbereiche liegen (siehe Tabelle 7). Wenn eine Kontrolle außerhalb ihres Validitätsbereiches liegt, sind die dazugehörigen Testergebnisse invalide, dürfen nicht berichtet werden und der Test muss wiederholt werden.

Wenn Ihre Laborqualitätsvorschriften einen häufigeren Einsatz von Kontrollen vorschreiben, folgen Sie diesen Anweisungen.

### Interne Kontrollen

Die interne Kontrolle ermöglicht den Nachweis von bisulfit-konvertierter ACTB (β-Aktin) DNA. Diese gleichzeitig amplifizierte Kontrolle überprüft die Probenqualität, der Probenvorbereitung sowie eine ausreichende DNA-Menge der Probe.

Ct-Werte der ACTB PCR, die außerhalb des spezifizierten Bereichs liegen (siehe Abschnitt 11.1), führen zu einem invaliden Patientenergebnis. Sie weisen auf sehr niedrige bisDNA-Mengen oder eine PCR-Inhibition hin.

## 13.0 Grenzen des Verfahrens

- Nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet.
- Dieses Produkt wurde ausschließlich für die Kombination von Epi BiSKit (M7-01-001), Epi proLung PCR Kit (M6-02-002) und Epi proLung Control Kit (M6-02-003) validiert. Die einzelnen Komponenten dürfen nicht durch alternative DNA-Extraktionsmethoden oder PCR Kits ersetzt werden.
- Dieses Produkt wurde für die Analyse von Plasma entwickelt. Es wurden ausschließlich die folgenden Blutentnahmeröhrchen validiert: BD Vacutainer® K2EDTA 10 ml, S-Monovette® 9 ml K3E und S-Monovette® 8,5 ml CPDA. Andere Arten von Patientenproben und andere Blutentnahmeröhrchen wurden nicht validiert.

- Die Verwendung dieses Produktes ist limitiert auf erfahrenes Personal, welches auf molekular diagnostische Methoden trainiert ist.

## 14.0 Spezifische Leistungsdaten

### Klinische Sensitivität und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des Epi proLung Tests wurde in einer Validierungsstudie bestimmt, die Daten von 360 klinischen Proben von Patienten aus den USA und Europa umfasst. Von diesen Patienten wurden 152 mit Lungenkrebs diagnostiziert (pathologisch bestätigt). 208 Patienten wurden nicht mit Lungenkrebs diagnostiziert, entweder da ein Screening Computertomographie Scan (CT-Scan) ohne Befund war oder da ein radiologischer Befund (pulmonaler Knoten) nicht zu einer Lungenkrebs-Diagnose führte.

Abbildung 4 zeigt die klinische Leistungsfähigkeit des Epi proLung Tests hinsichtlich der Fähigkeit zwischen Lungenkrebspatienten und klinischen Kontrollen zu unterscheiden. Die Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (ROC-Kurve) zeigt mögliche Kombinationen von Sensitivität und Spezifität, die sich durch unterschiedliche Schwellenwerte des EPLT-Wertes ergeben. Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) entspricht 0,82.

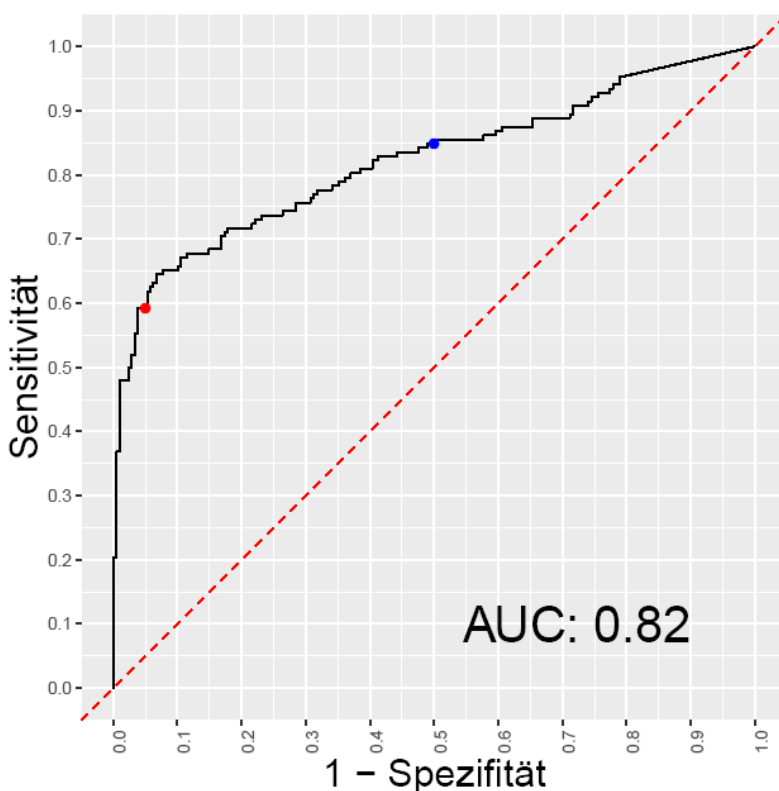


Abbildung 4: Klinische Leistungsfähigkeit des Epi proLung Tests: Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (ROC-Kurve) für die Diskriminierung zwischen Lungenkrebspatienten und klinischen Kontrollen. Die beiden Punkte markieren die Sensitivitäten bei einer Spezifität von 50% (blau) bzw. 95% (rot).

Tabelle 10: Schwellenwert, Sensitivität und Spezifität des Epi proLung Tests.

Schwellenwert	Sensitivität	Spezifität
-0,43	59 %	95 %
-1,85	85 %	50 %

Tabelle 10 zeigt die Sensitivitäten und Spezifitäten für zwei verschiedene Schwellenwerte. Abbildung 5 stellt die beobachtete Wahrscheinlichkeit einer Lungenkrebsdiagnose in der vorliegenden Studie als eine Funktion des EPLT-Wertes dar. Zudem sind die Sensitivitäten- und Spezifitäten dargestellt, die sich bei spezifischen Schwellenwerten auf der EPLT-Wert Skala ergeben.

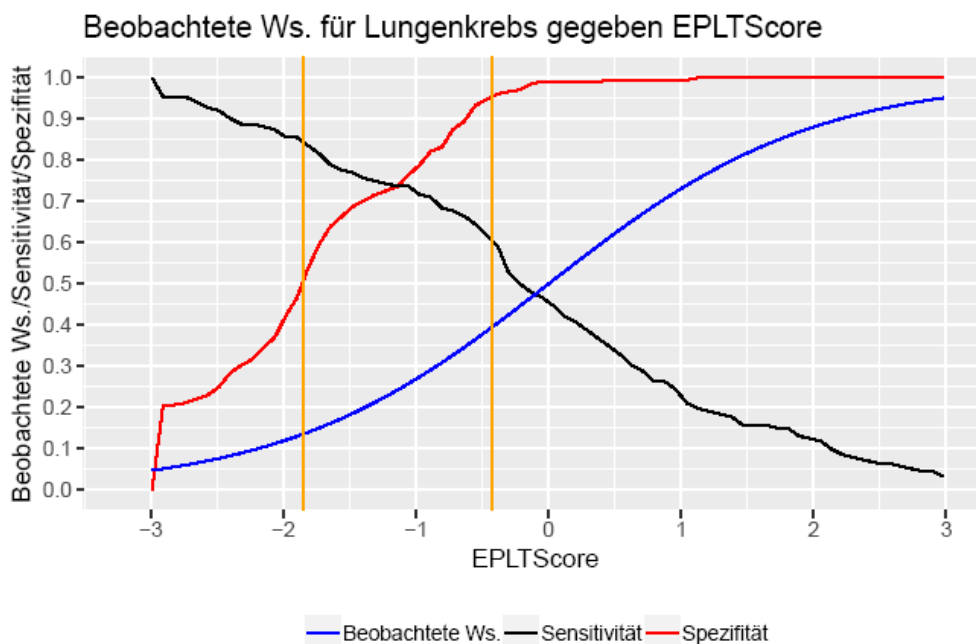


Abbildung 5: Funktionale Beziehung zwischen EPLT-Wert und beobachteter Wahrscheinlichkeit in der vorliegenden Studie mit Lungenkrebs diagnostiziert zu werden (blau); Sensitivitäten (schwarz) und Spezifitäten (rot) in Abhängigkeit von der Wahl eines Schwellenwertes auf der EPLT-Skala zur Dichotomisierung des Testresultats. Die vertikalen Linien (orange) markieren die Schwellenwerte für Spezifitäten von 50% sowie 95% (siehe Tabelle 10).

### Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde von vier Operatoren in 16 unabhängigen Läufen anhand von zwei verschiedenen Herstellungen von sechs technischen LoD (limit of detection) Proben untersucht. Die Proben enthielten methylierte DNA in Konzentrationen von 0, 2, 4, 8, 16 und 32 pg/ml in einem Hintergrund von 10ng/ml unmethylierter DNA.

Insgesamt wurden 192 LoD-Proben mit zwei verschiedenen Epi proLung PCR Kit Lots prozessiert. 190 Proben, die auf dem Applied Biosystems 7500 Fast Dx mit SDS v1.4 gemessen wurden, waren valide. Von den 159 Proben, die mit methylierter DNA gespikt wurden, waren 98 Proben positiv für SHOX2 und 117 Proben positiv für PTGER4. Alle 31 Proben, die nicht mit methylierter DNA bespikt wurden, waren negativ für beide Analyten. Mittels logistischer Regression ergab sich ein



LoD95 von 36 pg/ml (95 % Konfidenzintervall (KI): 19 pg/ml-67 pg/ml) für SHOX2 und 40 pg/ml (95 % KI: 18 pg/ml-87 pg/ml) für PTGER4.

### Reproduzierbarkeit und Präzision

Mittels verschiedener humaner Plasmapools, die mit Plasma von Lungenkrebs-Patienten gespikt wurden, wurde die Reproduzierbarkeit und Präzision des Tests untersucht. Insgesamt wurden sechs Pools mit verschiedenen Konzentrationslevel an methylierter SHOX2 und PTGER4 DNA getestet.

Es wurden 80 Replikate von jedem der sechs Plasma-Pools prozessiert und in 40 unabhängigen Läufen von vier Operatoren auf drei Applied Biosystems 7500 Fast Dx Real-Time PCR Geräten mittels drei verschiedener Epi proLung PCR Kit Lots (M6-02-002) getestet. 16 der 40 Läufe wurden von einem externen Labor durchgeführt. Von den 480 Proben waren 474 Proben valide. Für jede valide Probe wurde der minCt aus den drei Ct-Werten jeder Triplikat-PCR berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert aller minCts für jeden der sechs Probentypen berechnet. Die so berechneten Mittelwerte deckten einen Ct-Bereich von Ct 32,8 bis Ct 37,8 für SHOX2 und einen Ct-Bereich von Ct 34,1 bis 39,3 für PTGER4 ab. Zusätzlich wurden die Standardabweichung (SD) (SHOX2: 0,7-2,4 Ct; PTGER4: 0,5-2,2 Ct) und der Variationskoeffizient (CV) (SHOX2: 2,0-6,5%; PTGER4: 1,5-5,5%) für jeden Plasma-Pool berechnet.

Für die folgenden Komponenten wurde eine Varianzanalyse durchgeführt: Tag-zu-Tag (beinhaltet Lauf Variabilität, PCR Kit Lot Variabilität und Gerätevariabilität), Operator-zu-Operator, Labor-zu-Labor sowie die Varianz innerhalb eines Laufs (Wiederholbarkeit). Die Varianz innerhalb eines Laufs trug am meisten zur Gesamtvarianz bei. Am geringsten war die Operator-zu-Operator Varianz. Alle minCt-, SD- und CV-Werte sind in Tabelle 11 gelistet.

Tabelle 11: Ergebnisse bezüglich Präzision und Reproduzierbarkeit des Epi proLung Tests. Die Ergebnisse zeigen die Gesamt- Standardabweichung (SD), den Gesamt-Variationskoeffizient (CV) sowie die einzelnen Varianzkomponenten als Standardabweichung (SD).

Assay	Probe	Mittelwert minCt [Ct]	Gesamt SD [Ct]	Gesamt CV [%]	Tag- zu- Tag* SD [Ct]	Operator- zu- Operator SD [Ct]	Labor- zu- Labor SD [Ct]	Wiederholbarkeit (Varianz innerhalb eines Laufs) SD [Ct]
<b>SHOX2</b>	Plasma Pool 1	33,4	0,7	2,0	0,2	0,1	0,5	0,4
	Plasma Pool 2	35,4	0,9	2,5	0,4	0,2	0,4	0,7
	Plasma Pool 3	37,8	2,4	6,5	1,1	0	0,0	2,2
	Plasma Pool 4	32,8	0,7	2,1	0,1	0,2	0,5	0,4
	Plasma Pool 5	34,8	0,8	2,2	0,3	0,2	0,3	0,6
	Plasma Pool 6	37,1	2,2	5,9	0	0,8	0,0	2,0
<b>PTGER4</b>	Plasma Pool 1	34,1	0,5	1,5	0,4	0	0,2	0,3
	Plasma Pool 2	35,9	0,6	1,8	0,5	0	0,1	0,3
	Plasma Pool 3	37,5	0,9	2,4	0,4	0	0,3	0,7
	Plasma Pool 4	35,3	0,6	1,6	0,4	0	0,3	0,3
	Plasma Pool 5	37,0	0,8	2,3	0,4	0	0,4	0,7
	Plasma Pool 6	39,3	2,2	5,5	0,8	0,1	0,6	2,0

\* Tag beinhaltet Lauf Variabilität, PCR Kit Lot Variabilität und Gerätevariabilität

### Kreuzreaktivität

Um eine Kreuzreaktivität innerhalb der Sequenzen auszuschließen, wurden die Sequenzen des Epi proLung Tests (Blocker, Primer und Sonden) mittels des BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) gegen das humane Genom abgeglichen und elektronische PCR-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass der Epi proLung Test spezifisch für die Amplifikation von bisDNA Sequenzen von methyliertem SHOX2 und PTGER4 ist und keinerlei Kreuzreaktivität innerhalb des menschlichen Genoms aufweist.

Darüber hinaus wurden 57 Proben von Patienten mit benignen Lungenerkrankungen (COPD, Pneumonie, Lungenemphysem, Interstitielle Lungenerkrankung) getestet. Der Epi proLung Test unterscheidet zwischen bösartigen und nicht-bösartigen Erkrankungen mit AUC = 0,73.

### Interferenz

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von potentiell kritischen Substanzen im Plasma keinen Einfluss auf die Ergebnisse des Epi proLung Tests hat. Zehn häufig im Plasma vorkommende Substanzen wurden ausgewählt und in der höchsten Plasmakonzentration getestet, in der sie im klinischen Umfeld auftreten.

Albumin (40 mg/ml), Bilirubin (0.2 mg/ml), Cholesterol (5 mg/ml), CPDA (20% v/v), D-(+) Glukose (10 mg/ml), Hämoglobin (10 mg/ml), K2EDTA (20 mg/ml), rote Blutzellen (0,4 % v/v), Triglyzeride (12 mg/ml) und Harnsäure (0,235 mg/ml) wurden jeweils in sechs Plasmaproben (drei Proben mit Analyten, drei Proben ohne Analyten) getestet. Keine der Substanzen zeigte Interferenz mit dem Epi proLung Test, wenn sie in der angegebenen Konzentration den Proben hinzugefügt wurde.

## 15.0 Glossar

---



Gebrauchsanweisung beachten

---

**IVD**

In-Vitro-Diagnostikum

---

**REF**

Artikelnummer

---

**LOT**

Chargennummer

---



Verwendbar bis

---



Hersteller

---



Temperaturbegrenzung

---



Ausreichend für <n> Prüfungen

---



Nicht wiederverwenden

---

**CONTROL-**

Kontrolle, negativ

---

**CONTROL+**

Kontrolle, positiv

---



CE Zeichen

---



Data Matrix, Kodierung

---

## 16.0 Referenzen

- 1 Weiss, G et al. Validation of the SHOX2/PTGER4 DNA Methylation Marker Panel for Plasma-Based Discrimination between Patients with Malignant and Nonmalignant Lung Disease. *Journal of Thoracic Oncology*, Volume 12, Issue 1 (2017)
- 2 Eads, C.A. et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, Volume 28, Issue 8, e32 (2000)

## 17.0 Kontaktinformationen

Epi proLung wird hergestellt von:

Epigenomics AG  
Geneststraße 5  
10829 Berlin, Germany

Für weitere Informationen und Hilfestellungen senden Sie bitte eine E-Mail oder rufen Sie an:

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

Telefon: +49 30 24345 222

Fax: +49 30 24345 555

## Informationen für den Käufer

Epi proLung® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Epigenomics AG. Alle anderen in diesem Dokument genannten Warenzeichen, Marken und Namen sind Eigentum der jeweiligen Firmen.

Applied Biosystems®, MicroAmp® sind eingetragene Warenzeichen von Life Technologies Corporation; DynaMag™ ist ein Warenzeichen der Life Technologies Corporation; FAM™ ist ein Warenzeichen von Applied Biosystems, LLC.; VIC® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Applied Biosystems, LLC.; TEXAS RED® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Molecular Probes Inc.; BD Vacutainer® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Becton Dickinson Inc./Corporation.; S-Monovette® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Sarstedt AG & Co.; ThermoMixer®, Eppendorf Research®, Reference®, Multipette®, ep Dualfilter T.I.P.S.®, Combitips advanced® und Repeater® sind eingetragene Warenzeichen von Eppendorf AG; Safe Lock™ ist ein Warenzeichen der Eppendorf AG.; HandyStep® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Brand GmbH + Co KG.; BrandTech® ist ein eingetragenes Warenzeichen von BrandTech Scientific, Inc.; VWR® PCR Sealing Film ist ein eingetragenes Warenzeichen von VWR International; Samco™ ist ein eingetragenes Warenzeichen von Samco Scientific Corporation.