

Srpen 2016

Příručka *therascreen*[®] IDH1/2 RGQ PCR Kit



Verze 1

Pro detekci 12 *IDH1* a *IDH2* mutací v gliomu

IVD

Pro in vitro diagnostické použití

Pro použití s přístrojem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R4 **MAT**

1075247CS

Obsah

Použití	4
Souhrn a vysvětlení.....	4
Princip procedury	6
Materiál poskytovaný se soupravou	8
Obsah soupravy	8
Materiál, který není součástí soupravy	10
Upozornění a bezpečnostní opatření	12
Bezpečnostní informace	12
Obecná upozornění	12
Skladování a práce s reagensiemi	13
Podmínky zaslání	13
Skladování.....	14
Stabilita	14
Práce se vzorky a uchování vzorků.....	14
Postup	16
Extrakce a příprava DNA	16
Protokol: Detekce mutací IDH1/2.....	19
Postup	22
Interpretace výsledků	24
Kontroly s vodou.....	24
Kontrola kvality s použitím hodnot C_T kontrol.....	24
Validace vstupního vzorku	27

Výsledky vzorku	27
Řešení problémů	33
Kontrola kvality	37
Omezení	37
Výkonnostní charakteristiky	39
Limit blanku (LOB)	39
Limit detekce (LOD)	39
Efekt vstupní DNA	41
Opakovatelnost a reproducibilita	41
Metody srovnání	44
Reference	47
Symboly	49
Informace pro objednání	51

Použití

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je in vitro diagnostický test založený na technologii PCR pro kvalitativní detekci 7 mutací *IDH1* genu a 5 mutací genu *IDH2*, a pro přímou identifikaci 3 hlavních mutací v DNA izolované z formalinem fixovaných, v parafínu zalitých tkání (FFPE) lidského mozku.

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je určena jako pomůcka pro klasifikaci gliomů.

Souhrn a vysvětlení

Mutace v genech pro isocitrát dehydrogenázu (IDH)s, *IDH1* and *IDH2*, jsou dle World health Organization (WHO) časté u gliomů stupně II a III dospělých pacientů a sekundárních glioblastomů stupně IV (GBM). Kromě jejich diagnostické hodnoty je přítomnost mutací *IDH1/2* spojena s pozitivní prognózou pacientů s gliomy (1-13).

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je testovací souprava pro detekci 12 specifických *IDH1/2* mutací: 6 v kodonu 132 genu *IDH1*, 5 v homologním kodonu 172 genu *IDH2* a jedné v kodonu 100 genu *IDH1* (Tabulka 1). Souprava také přímo identifikuje hlavní mutace *IDH1* a *IDH2* vedoucí k substitucím *IDH1* R132H, *IDH1* R132C a *IDH2* R172K.

Tabulka 1. IDH1 a IDH2 mutace detekované s použitím *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kitu

Gen	Mutace	Záměna	COSMIC ID*
<i>IDH1</i>	Arg132His (R132H)	395G>A	COSM28746
	Arg132Cys (R132C)	394C>T	COSM28747
	Arg132Ser (R132S)	394C>A	COSM28748
	Arg132Gly (R132G)	394C>G	COSM28749
	Arg132Leu (R132L)	395G>T	COSM28750
	Arg132Val (R132V)	394_395CG>GT	COSM28751
	Arg100Gln (R100Q)	299G>A	COSM88208
<i>IDH2</i>	Arg172Lys (R172K)	515G>A	COSM33733
	Arg172Met (R172M)	515G>T	COSM33732
	Arg172Trp (R172W)	514A>T	COSM34039
	Arg172Ser (R172S)	516G>T	COSM34090
	Arg172Gly (R172G)	514A>G	COSM33731

* COSMIC ID pochází z databáze "Catalog of Somatic Mutations in Cancer" (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Princip procedury

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit poskytuje reagentie pro provedení 9 samostatných amplifikačních reakcí pro detekci 12 mutací (Tabulka 1):

- 3 celkových amplifikačních reakcí pro kodony 132 a 100 v genu *IDH1* a kodonu 172 v genu *IDH2*
- 3 mutačních amplifikačních reakcí pro kodony 132 a 100 genu *IDH1* a kodon 172 genu *IDH2*
- 3 mutačně-specifické amplifikační reakce mutací *IDH1* R132H, *IDH1* R132C a *IDH2* R172K

Reakční směs

Směs primerů a prób (PPM-Total) používá primery a próby k amplifikaci obou mutovaných a wild-type cílových sekvencí (Obrázek 1).

Reakční směsi pro detekci mutací

Primery pro detekci mutace a směsi sond kombinují primery a sondy pro amplifikaci mutovaných i wild-type cílových sekvencí plus oligonukleotidu 3' blokovaného přidáním fosfátové skupiny, aby se zabránilo elongaci (tzv. PCR clamping), což je specifické pro wild-type cílovou sekvenci.

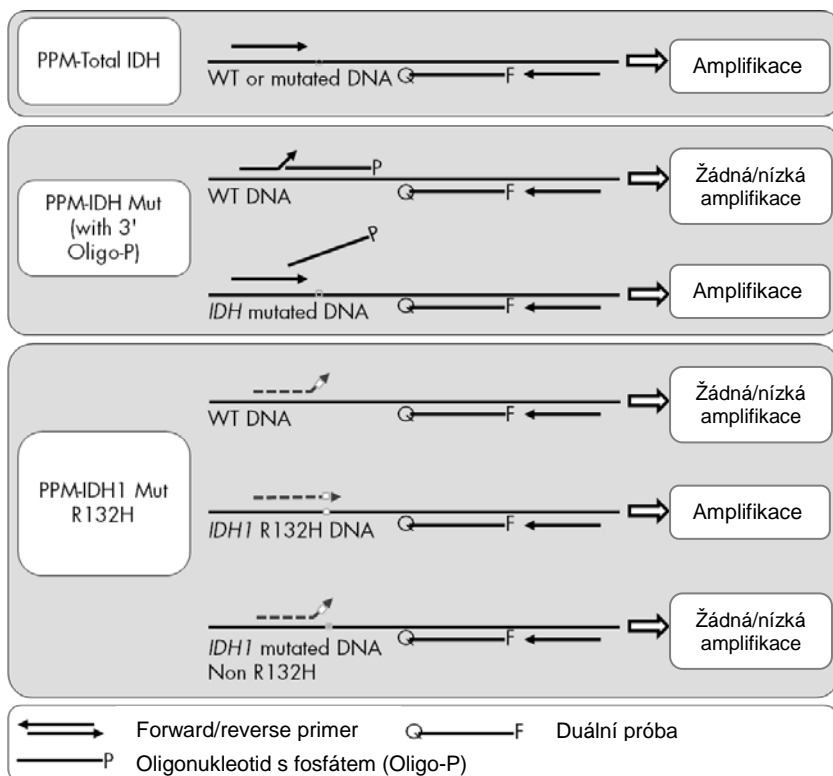
Pokud templát PCR obsahuje sekvenci divokého typu, 3'-fosfátový oligonukleotid bude mít dominantní vliv na vazbu PCR primeru kvůli vyšší afinitě. Nebude pak existovat žádné nebo nízké prodloužení DNA polymerázou a nebude pozorována žádná nebo nízká amplifikace.

Pokud je přítomna mutovaná sekvence, vazba PCR primeru bude převažovat nad vazbou 3'-fosfátového oligonukleotidu a bude pokračovat amplifikace (Obrázek 1).

Reakční směsi pro identifikaci mutací

Allela-specifická amplifikace je dosažena pomocí ARMS (Amplification Refractory Mutation System), který využívá schopnost DNA polymerázy rozlišovat mezi shodou a nesouladem na 3' konci PCR primeru.

Když je PCR primer zcela shodný, amplifikace pokračuje s plnou účinností. Pokud 3' báze nesouhlasí, dochází pouze k nízké úrovni amplifikace pozadí (Obrázek 1).



Obrázek 1. Výsledky získané se směsi primerů a prób v soupravě *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit. Stejný princip, který je ukázán pro detekci *IDH1* R132H je aplikován pro *IDH1* R132C a *IDH2* R172K.

Materiál poskytovaný se soupravou

Obsah soupravy

<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalogové číslo		873011
Počet reakcí		20
Směs primerů a prób pro detekci total <i>IDH1/R132</i> (Wild Type a Mutovaný)	PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Směs primerů a prób pro detekci total <i>IDH2/R172</i> (Wild Type a Mutovaný)	PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Směs primerů a prób pro detekci total <i>IDH1/R100</i> (Wild Type a Mutovaný)	PPM-Total <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Směs primerů a prób (včetně Oligo-P) pro detekci mutovaného <i>IDH1/R132</i>	PPM- <i>IDH1/R132</i> Mut 25x	40 µl
Směs primerů a prób (včetně Oligo-P) pro detekci mutovaného <i>IDH2/R172</i>	PPM- <i>IDH2/R172</i> Mut 25x	40 µl
Směs primerů a prób (včetně Oligo-P) pro detekci mutovaného <i>IDH1/R100</i>	PPM- <i>IDH1/R100</i> Mut 25x	40 µl
Směs primerů a prób pro identifikaci <i>IDH1</i> Mut R132H	PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x	40 µl

Table continued on next page

Obsah soupravy (pokračování)

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalogové číslo		873011
Počet reakcí		20
Směs primerů a prób pro identifikaci <i>IDH1</i> Mut R132C	PPM-IDH1 Mut R132C 25x	40 µl
Směs primerů a prób pro identifikaci <i>IDH2</i> Mut R172K	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Wild Type genomická DNA	IDH1/IDH2 WT kontrola	270 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Mutovaná pozitivní kontrola	IDH1/IDH2 Pozitivní kontrola	270 µl
Směs <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ a pufr pro qPCR	qPCR Master Mix 2x	5 x 900 µl
Voda (bez nukleáz)	Nuclease-Free Water	5 x 525 µl
Příručka therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit (Anglická verze)		1

Materiál, který není součástí soupravy

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Více informací naleznete v příslušných bezpečnostních listech (BL), k dispozici jsou u dodavatele produktu.

Důležité: Ujistěte se, že použité přístroje byly zkontrolovány a kalibrovány dle doporučení výrobce.

Reagencie (manuální extrakce DNA)

- Souprava pro extrakci DNA: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (kat. č. 56404)
- RNase A (17,500 U) (kat. č. 19101)
- Xylen nebo Histolemon™ (Carlo Erba, kat. č. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96–100%)
- Pufr 1x TE, pH 8.0

Reagencie (automatizovaná extrakce DNA)

- Souprava pro extrakci DNA: QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (kat. č. 937236)
- Pufr ATL (kat. č. 19076 or 939016)
- RNase A (kat. č. 19101)
- Xylen nebo Histolemon (Carlo Erba, kat. č. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96–100%)
- Pufr 1x TE, pH 8.0

Spotřební materiál

- Skalpely
- Sterilní PCR špičky s filtrem
- Zkumavky o objemu 2.0 ml nebo 1.5 ml (bez nukleáz)

- Stripové zkumavky s víčkem, 0.1 ml, pro Rotor-Gene Q (kat. č. 981103 nebo 981106)
- Led

Další spotřební materiál pro automatizovanou extrakci DNA

- Sample Prep Cartridges, 8-well (kat.č.997002)
- 8-Rod Covers (kat.č.997004)
- Špičky s filtrem, objem 200 µl (kat. č. 990332) a 1500 µl (kat. č. 997024)
- Eluční mikrozukavky CL (kat.č. 19588)
- Mikrozukavky 2.0 ml Type H (Sarstedt®, kat. č. 72.693, www.sarstedt.com)

Vybavení

- Stojan na sklíčka a 2 kompatibilní sklíčkové lázně pro xylen/Histolemon a etanol
- Mikropipety určené pro PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stolní centrifuga s rotorem pro 0.5 ml/1.5 ml reakční zkumavky a mikrodestičky (schopná vyvinout rychlost 13,000–14,000 rpm)
- Stolní vortex
- Přístroj pro real-time PCR: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM a specifický materiál pro jeho provoz
- Rotor-Gene Q MDx se softwarovou verzí 2.1.0 nebo vyšší
- Biofotometr
- Termomixer, vyhřívaný orbitální inkubátor, termoblok nebo vodní lázeň umožňující inkubaci na 56°C a 90°C

Vybavení pro automatizovanou izolaci

- Přístroj QIASymphony SP
- QIASymphony SP softwarová verze 4.0 nebo vyšší

Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro.

Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Více informací naleznete v příslušných bezpečnostních listech (BL), k dispozici jsou online v PDF formátu na www.qiagen.com/safety, kde najdete bezpečnostní listy pro každý kit a součást kitu QIAGEN.

Bezpečnostní informace o použitých izolačních kitech naleznete v příslušných příručkách. Bezpečnostní informace k přístrojům naleznete v uživatelském manuálu.

Obecná upozornění

- Test je určen pro použití s pufovanými vzorky ve formalinem fixovaných, v parafínu zalitých tkání z chirurgické resekce (FFPE).
- Všechny chemikálie a biologické materiály jsou potenciálně hazardní. Vzorky mohou být potenciálně infekční a musí s nimi být zacházeno jako s biohazardním materiálem.
- Zlikvidujte vzorky a odpad po testování dle příslušných místních bezpečnostních předpisů.
- Reagencie pro soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit jsou optimálně naředěny. Dále nenařezujte reagencie, protože to by mohlo vést k snížení výkonu soupravy. Nepoužívejte reakční objemy (reakční mix plus vzorek) nižší než 25 μ l.
- Všechny reagencie dodávané se soupravou *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit jsou určeny pouze pro použití s reagenty obsaženými v soupravě. Nepřenášejte žádné reagencie mezi soupravami *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kits, mohlo by dojít k ovlivnění výkonu soupravy.

- Další upozornění a bezpečnostní opatření naleznete v uživatelském manuálu k přístroji Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Změna inkubace a teploty může vest k chybným nebo nesourodým datům.
- Nepoužívejte expirované nebo nesprávně skladované součásti soupravy.
- Směsi primerů a prób mohou být změněny po vystavení světlu.
- Dbejte extrémní opatrnosti, abyste předešli kontaminaci směsí se syntetickými materiály obsaženými v činidle s pozitivní kontrolou.
- Dbejte extrémní opatrnosti, abyste předešli kontaminaci DNAzami, které mohou způsobit degradaci templátové DNA.
- Používejte pipety určené pouze k míchání reakčních směsí a přidání templátu.
- Přípravu a rozpipetování reakčních směsí provádějte v prostoru odděleném od prostoru kde přidáváte templát.
- Neotevírejte přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dokud běh nedoběhne.
- Neotevírejte zkumavky po doběhnutí běhu v přístroji Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Je třeba dbát opatrnosti, aby se zajistilo správné testování vzorků s důrazem na vstup vzorku, chyby naplnění a chyby pipetování.

Skladování a práce s reagensii

Podmínky zaslání

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je zasílána na suchém ledu. Pokud je jakákoliv součást soupravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit rozmražená, obal byl poškozen během přepravy nebo balení neobsahuje příručku nebo reagentie, prosím, kontaktujte QIAGEN technický servis nebo lokálního distributora (viz. www.qiagen.com).

Skladování

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit by měla být skladována ihned po převzetí při teplotě -15 až -30°C a chráněná před světlem.

Stabilita

Pokud jsou dodrženy podmínky skladování, vydrží souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit stabilní až do doby expirace.

Po otevření by měly být reagenty skladovány v originálním balení při teplotě -15 to -30°C až do doby expirace uvedené na balení. Vyvarujte se opakovanému rozmrazení a zamrazení. Nepřekračujte maximálně 5 rozmrazení.

Práce se vzorky a uchování vzorků

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je určena pro použití s DNA vzorky izolovanými z formalinem fixovaných, v parafínu zalitých tkání (FFPE) tumorové tkáň z operačních resekcí z nádorů mozku. Veškeré vzorky tkáně by měly být považovány za potenciálně nebezpečné.

- Vzorky tkáně musí být zafixovány v 4–10% neutrálním pufovaném formalínu (NBF).
- 10 μm sekce musí být vyřezány z parafínových bločků a naneseny na skleněné sklíčko.
- Trénovaný specialista (jako např. patolog) by měl posoudit tumor a jeho okolní tkáň barvenou hematoxylinem a eosinem (H&E). Pro izolaci DNA použijte sériově řezané sekce.
- Pouze sekce s obsahem $\geq 40\%$ tumoru jsou vhodné pro testování.

-
- V případě sekci obsahujících <math><50\text{ mm}^2</math> tkáně je doporučeno zpracovat dostatečné množství sekci, aby se navýšila celková oblast tkáně na alespoň 50 mm^2 (100 mm^2 v případě automatizované izolace na přístroji QIASymphony SP).
 - Označte, manipulujte a skladujte nádorové vzorky, bločky, slíčka nebo vzorky připravené pro extrakci dle Vašich laboratorních zvyklostí a postupů.
 - FFPE bločky a slíčka skladujte při pokojové teplotě. Slíčka mohou být skladována při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů před izolací DNA pro účely použití se soupravou *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
 - Po izolaci může být DNA skladována až 1 týden při $2\text{--}8^\circ\text{C}$ nebo 8 týdnů při -15 to -25°C .

Postup

Extrakce a příprava DNA

Pro izolaci genomové DNA z FFPE vzorků z nádoru mozku použijte QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat. č. 56404) nebo QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (kat. č. 937236).

Poznámka: Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit byla validována pouze v kombinaci se soupravami QIAamp DNA FFPE Tissue Kit nebo QIAasymphony DSP DNA Mini Kit. Nepoužívejte jiné produkty pro extrakci DNA.

Použití soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit



Čtěte prosím pečlivě následující modifikace, které jsou v rámci protokolu QIAamp soupravy.

- Pro správnou přípravu vzorků před deparafinizací a extrakcí DNA čtěte instrukce v sekci “Vstupní materiál” v příručce k soupravě *QIAamp DNA FFPE Tissue kit* a “Práce se vzorky a uchování vzorků”, strana 14 v této příručce.
- Souprava QIAamp DNA FFPE Tissue Kit musí být používána pouze manuálně.
- Musí být proveden RNasový krok popsáný v příručce *QIAamp DNA FFPE Tissue*.
- Nepoužívejte deparafinizační roztok od QIAGENU. Pro deparafinizaci používejte pouze metodu xylenu/etanolové deparafinizace, která je popsána v sekci “Deparafinizace řezů při použití soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit”, viz. níže. Xylen může být nahrazen Histolemonem (substitut xylenu).
- Krok se štěpením pomocí proteinázy K musí být prováděn po dobu 1 hodiny.
- Vzorky musí být eluovány dvakrát do 30 µl elučního pufru (pufr ATE), který je součástí soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Postup deparafinizace řezů, při použití soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

1. Umístěte sklíčko s řezem do specifického stojánku.
2. Vložte tento stojánek se sklíčkem do lázně obsahující xylen nebo histolemon po dobu 2 minut. Zamíchejte 2 nebo 3 pohyby dopředu a dozadu lázni.
3. Umístěte stojánek do druhé lázně obsahující etanol (96–100%) po dobu 2 minut. Zamíchejte 2 nebo 3 pohyby dopředu a dozadu lázni.
4. Osušte sklíčka při teplotě 15–37°C, to může trvat i několik minut.
5. Označte si 1.5 ml mikrocentrifugační zkumavku pro každý vzorek a přidejte 180 µl pufru ATL (součást QIAamp DNA FFPE Tissue Kitu) do každé zkumavky.
6. Kápněte pár kapek pufru ATL na výsek tkáně na sklíčku (dostatečné množství tak, aby pokrylo povrch tkáně).
7. Seškrábejte oblast se tkání sterilním skalpelem a přidejte naškrábanou tkáň do příslušné označené mikrocentrifugační zkumavky.
8. Přidejte 20 µl proteinázy K (součást QIAamp DNA FFPE Tissue Kitu) do každé zkumavky a zamíchejte vortexováním.
9. Inkubujte při 56°C po dobu 1 hodiny.

Pokračujte inkubací při teplotě 90°C dle protokolu soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (krok 12 v příručce *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook*, červen 2012, strana 13).

Použití soupravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit



Pozorně čtěte následující modifikace, které je potřeba použít pro QIASymphony SP protokolový list: Tissue_LC_200_V7_DSP.

- Pro správnou přípravu vzorků před deparafinizací a extrakcí DNA čtěte instrukce v sekci “Práce se vzorky a uchování vzorků”, strana 14.
- Musí být proveden RNasový krok popsany v protokolovém listě QIASymphony SP.

- Nepoužívejte deparafinizační roztok od QIAGENU. Pro deparafinizaci používejte pouze metodu xylenu/etanolové deparafinizace, která je popsána v sekci “Deparafinizace řezů při použití soupravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit”, viz. níže. Xylen může být nahrazen histolemonem (substitut xylenu).
- Krok se štěpením pomocí proteinázy K musí být prováděn po dobu 1 hodiny.
- Pomocí dotykové obrazovky vyberte eluční objem 50 μ l.

Postup deparafinizace řezů, při použití soupravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Deparafinizaci provádějte dle následujících kroků, které jsou odlišné od protokolu v rámci protokolového listu QIASymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Umístěte sklíčko s řezem do specifického stojánu.
2. Vložte tento stojánek se sklíčkem do lázně obsahující xylenu nebo histolemon po dobu 2 minut. Zamíchejte 2 nebo 3 pohyby dopředu a dozadu lázně.
3. Umístěte stojánek do druhé lázně obsahující etanol (96–100%) po dobu 2 minut. Zamíchejte 2 nebo 3 pohyby dopředu a dozadu lázně.
4. Osušte sklíčka při teplotě 15–37°C, to může trvat i několik minut.
5. Označte si 1.5 ml mikrocentrifugační zkumavku pro každý vzorek a přidejte 220 μ l pufru ATL do každé zkumavky.
6. Kápněte pár kapek pufru ATL na výsek tkáně na sklíčku (dostatečné množství tak, aby pokrylo povrch tkáně).
7. Seškrábejte oblast se tkání sterilním skalpelem a přidejte naškrábanou tkáň do příslušné označené mikrocentrifugační zkumavky.
8. Přidejte 20 μ l proteinázy K (součást soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) do každé zkumavky a zamíchejte vortexováním.

Pokračujte inkubací při teplotě 56°C uvedené v protokolovém listě QIASymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP protocol (krok 12 v protokolu “Deparafinizace pomocí xylenu”, duben 2012). Inkubujte při 56°C po dobu 1 hodiny.

Genomická DNA

Genomickou DNA skladujte při teplotě 2–8°C po dobu 1 týden po izolaci nebo 8 týdnů při teplotě –15 to –25°C.

Kvantita DNA by měla být stanovena měřením optické denzity (OD) vzorku při vlnové délce 260 nm.

DNA naředte na koncentraci 5 ng/μl v 1x TE pufru o pH 8.0.

PCR reakce je optimalizována pro vzorky obsahující 25 ng izolované genomické DNA.

Protokol: Detekce mutací *IDH1/2*

Důležité body před započítím práce

- Pro optimální použití soupravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit musí být zpracovány vzorky v sadách po 4. Menší sady povedou k tomu, že bude možné testovat méně vzorků se soupravou *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- Doporučujeme testovat všechny vzorky jednou na běh PCR, jak je uvedeno v Tabulce 2 a s rozložením pipetování a nastavení rotoru dle 3 a obrázku 2.

Tabulka 2. Počet reakcí pro přístroj Rotor-Gene Q MDx s 72-zkumavkovým rotorem

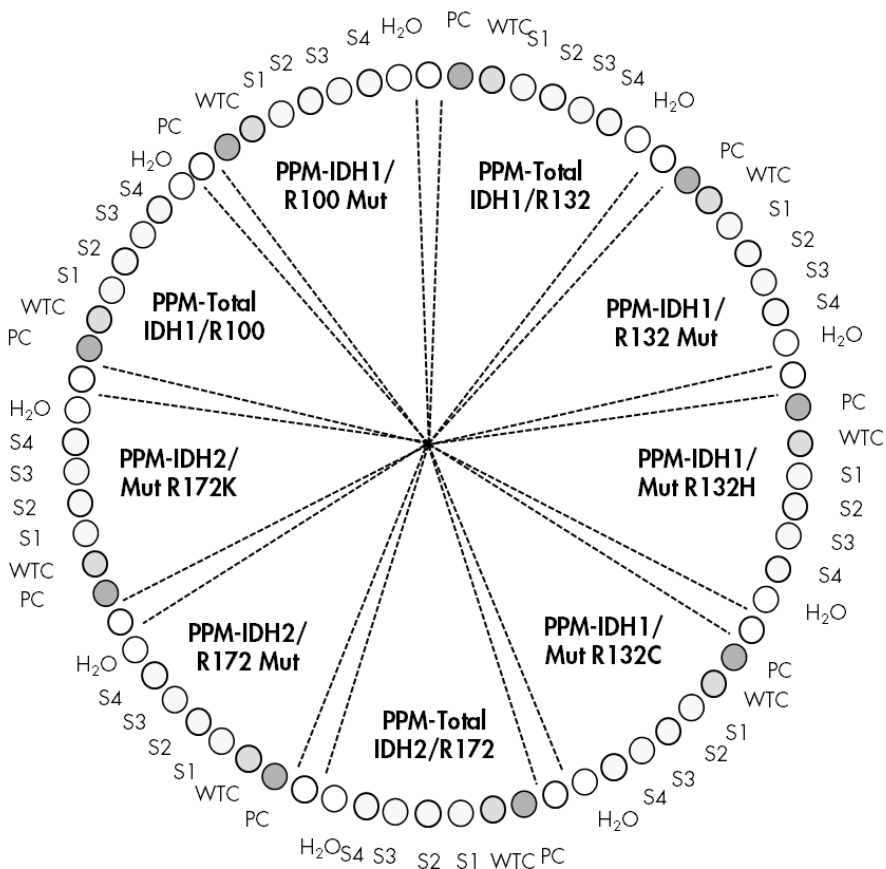
Vzorky	Reakce
n vzorků DNA	n x 1 reakce
2 kontroly DNA	2 reakce: Pozitivní a WT kontroly, každá testována jednou na běh PCR
Kontrola s vodou	1 reakce

Tabulka 3. Návrh rozložení pipetování pro experiment s *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR

Vzorek	Total IDH1/ R132 Mut	IDH1 Mut R132H	IDH1 Mut R132C	Total IDH2/ R172 Mut	IDH2/ R172 Mut	IDH2 Mut R172K	Total IDH1/ R100 Mut	IDH1/ R100 Mut	
Mut PC*	1	9	17	25	33	41	49	57	65
WTC†	2	10	18	26	34	42	50	58	66
S1	3	11	19	27	35	43	51	59	67
S2	4	12	20	28	36	44	52	60	68
S3	5	13	21	29	37	45	53	61	69
S4	6	14	22	30	38	46	54	62	70
H ₂ O	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Prázdňá zkumavka	8	16	24	32	40	48	56	64	72

* PC: Pozitivní kontrola.

† WTC: Wild-type kontrola.



Obrázek 2. Návrh rozložení rotoru pro experiment se soupravou *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Poznámka: Ujistěte se, že vždy umístíte vzorek do polohy 1 v rotoru. V opačném případě přístroj nebude provádět kalibraci a budou získána nesprávná fluorescenční data.

Postup

1. Rozmrazte všechny potřebné součásti a umístěte je na led.
2. Připravte následující směs pro PCR dle počtu zpracovávaných.

Všechny koncentrace jsou pro finální reakční objem.

Tabulka 4 popisuje pipetovací schema pro přípravu jedné reakční směsi vypočítané pro konečný objem reakce 25 μ l. Pre-mix může být připraven pro každou směs prumerů a prób (PPM) dle počtu reakcí. Pro kompenzaci pipetovací chyby je zahrnut i objem navíc.

Tabulka 4. Příprava směsi pro PCR

Komponenta	1 reakce (μ l)	Pre-mix: 7 + 1 reakcí(μ l)	Konečná koncentrace
qPCR Master Mix, 2x	12.5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Voda bez nukleáz	6.5	52	–
Vzorek nebo kontrola [†] (bude přidán v kroku 4)	5	5 každý	–
Total volume	25	25 každý	–

* Připravte 9 pre-mixů, jeden pro každý PPM poskytovaný v soupravě.

[†] Pozitivní kontrola, negativní kontrola nebo kontrola s vodou.

3. Nadávkujte 20 μ l roztoku pre-mixu do každé zkumavky pro Rotor-Gene (Tabulka 3).
4. Přidejte 5 μ l materiálu, který bude kvantifikován (25 ng vzorku genomické DNA nebo kontroly) do příslušné zkumavky (celkový objem 25 μ l; Tabulka 3).
5. Jemně zamíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Umístěte zkumavku do rotoru přístroje (Obrázek 2).

Nepoužívané pozice je potřeba vyplnit prázdnými zkumavkami.

7. Naplňte plně rotor přístroje Rotor-Gene Q MDx.
8. Naprogramujte přístroj Rotor-Gene Q MDx dle teplotního programu uvedeného v tabulce 5.

Tabulka 5. Teplotní profil

Hold	Teplota: 95°C Čas: 10 min
Cyklování	40x 95°C po dobu 15 sec 60°C po dobu 60 sec s akvizicí FAM™ fluorescence v Zeleném kanále: Jednotlivě

9. Klikněte na **Gain Optimisation** v dialogovém okně **New Run Wizard**, abyste otevřeli dialogové okno **Auto-Gain Optimisation Setup**. Nastavte rozpětí Zeleného kanálu od **2FI** pro **Min Reading** až **10FI** pro **Max Reading**.
10. Zatrhnete okénko **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** a zavřete dialogové okno **Auto-Gain Optimisation Setup**.
11. Spusťte cyklování teplotního programu.
12. Po ukončení cyklování proveďte následující kroky.
 - Vyberte **Options** a **Crop Start Cycles**. Odstraňte data před cyklem **10**, abyste odstranili artefakty.
 - Vyberte **Analysis** a **Cycling A. Green od 10**, naznačeno v reportu jako “left threshold = 10.00”.
 - Vyberte jako normalizační metodu **Dynamic Tube** a **Slope Correct** pro úpravu šumu sklonu.
 - Nastavte **Outlier Removal** na hodnotu **0%** (dle hraniční hodnoty v NTC).
 - Deaktivujte **Reaction Efficiency Threshold**.
 - Definujte threshold na **0.03**.
 - Nastavte graf na lineární měřítko.
 - Vyberte **Digital Filter: Light**.

Interpretace výsledků

Kontroly s vodou

Kontroly s vodou (kontroly bez templátu) by měly poskytnout nulové hodnoty C_T pro všechny směsi primerů a prób.

Pokud je získána pozitivní hodnota C_T s kontrolou s vodou, jedná se o křížovou kontaminaci. Postupujte dle doporučení v sekci “Řešení problémů”, strana 33.

Kontrola kvality s použitím hodnot C_T kontrol

Wild-type kontrola (WTC) *IDH1/2* a mutovaná pozitivní kontrola *IDH1/2* (Mut-PC) umožňují kvalitativně ohodnotit experiment.

Pro každou kontrolu spočítejte ΔC_T hodnoty následovně.

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R132 Mut} = C_T \text{ IDH1/R132 Mut} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2/R172 Mut} = C_T \text{ IDH2/R172 Mut} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R100 Mut} = C_T \text{ IDH1/R100 Mut} - C_T \text{ Total IDH1/R100}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132H} = C_T \text{ IDH1 Mut R132H} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132C} = C_T \text{ IDH1 Mut R132C} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 Mut R172K} = C_T \text{ IDH2 Mut R172K} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

Jestliže je pro vzorek spočítána hodnota C_T 0, použijte C_T hodnotu 40 pro výpočet hodnoty ΔC_T .

Kontroly jsou klasifikovány jako mutace-pozitivní pokud jsou hodnoty ΔC_T nižší nebo rovny příslušným ΔC_T mezním hodnotám uvedeným v Tabulce 6.

Tabulka 6. Cutoff hodnoty pro každou mutační assay

Mutační assay	Mezní hodnota (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5.34
IDH2/R172 Mut	6.42
IDH1/R100 Mut	4.65
IDH1 Mut R132H	6.87
IDH1 Mut R132C	7.14
IDH2 Mut R172K	8.49

- Wild-type kontrola *IDH1/2* musí být detekována jako mutace-negativní pro každou mutační assay (Tabulka 7).
- Pozitivní mutovaná kontrola *IDH1/2* musí být detekována jako mutace-pozitivní pro každou mutační assay (Tabulka 7).

Celý experiment je znehodnocen, pokud obě výše uvedené podmínky nebudou splněny.

Tabulka 7. Příklad validačního běhu na kontrolách

Hodnota	Voda (NTC)	IDH1/IDH2 WT kontrola	IDH1/IDH2 Pozitivní kontrola
C _T Total IDH1/R132	Nedekováno	25.45	23.95
C _T IDH1/R132 Mut	Nedekováno	34.32	25.76
ΔC _T IDH1/R132 Mut	Nedekováno	8.87	1.81
C _T Total IDH2/R172	Nedekováno	25.42	24.93
C _T IDH2/R172 Mut	Nedekováno	34.36	26.36
ΔC _T IDH2/R172 Mut	Nedekováno	8.94	1.43
C _T Total IDH1/R100	Nedekováno	26.30	24.69
C _T IDH1/R100 Mut	Nedekováno	33.04	26.39
ΔC _T IDH1/R100 Mut	Nedekováno	6.74	1.70
C _T IDH1 Mut R132H	Nedekováno	35.20	26.48
ΔC _T IDH1 Mut R132H	Nedekováno	9.75	2.53
C _T IDH1 Mut R132C	Nedekováno	37.16	27.07
ΔC _T IDH1 Mut R132C	Nedekováno	11.71	3.12
C _T IDH2 Mut R172K	Nedekováno	40.00	27.97
ΔC _T IDH2 Mut R172K	Nedekováno	14.58	3.04

Validace vstupního vzorku

Před interpretací musí být vstupní vzorek validován.

Získaná hodnota C_T pro vzorek s každým PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ a $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) musí být nižší než 32.00. $C_{T \text{ Total}}$ hodnoty ≥ 32.00 jsou způsobeny nízkou kvalitou DNA. Vzorek musí být opětovně testován. Pokud je kvantita DNA stále nedostačující, vyextrahujte více tumorové tkáně, pokud je to možné (viz "Řešení problémů", strana 33).

Výsledky vzorku

Detekce mutace *IDH1/2*

Pro každý vzorek spočítejte hodnoty ΔC_T získané z každé mutační assaye (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut) následovně.

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R132 Mut}} = C_{T \text{ IDH1/R132 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH2/R172 Mut}} = C_{T \text{ IDH2/R172 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R100 Mut}} = C_{T \text{ IDH1/R100 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$$

Pokud je získána nulová hodnota C_T vzorku, použijte C_T hodnotu 40 pro výpočet hodnoty ΔC_T .

Vzorky jsou klasifikovány jako mutace-pozitivní pokud jsou hodnoty ΔC_T nižší nebo rovny příslušným ΔC_T mezním hodnotám mutační detekční assaye uvedených v Tabulce 8.

Tabulka 8. Mezní hodnoty pro každou mutační detekční assay

Mutační assay	Mezní hodnota (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5.34
IDH2/R172 Mut	6.42
IDH1/R100 Mut	4.65

Identifikace mutace *IDH1/2*

Pro každý vzorek spočítejte hodnoty ΔC_T získané z každé mutační assaye (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K) následovně.

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132H} = C_T \text{ IDH1 Mut R132H} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132C} = C_T \text{ IDH1 Mut R132C} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 Mut R172K} = C_T \text{ IDH2 Mut R172K} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

Pokud je získána hodnota 0 C_T vzorku, použijte C_T hodnotu 40 pro výpočet ΔC_T hodnoty.

Mutované vzorky jsou identifikovány, pokud je ΔC_T hodnota nižší nebo rovna ΔC_T cutoff hodnotě příslušné mutační identifikační assaye uvedené v Tabulce 9. Příklady interpretace ΔC_T jsou ukázány v Tabulce 10 a Tabulce 11.

Tabulka 9. Mezní hodnoty pro každou mutační identifikační assay

Mutační assay	Mezní hodnota (ΔC_T)
IDH1 Mut R132H	6.87
IDH1 Mut R132C	7.14
IDH2 Mut R172K	8.49

Tabulka 10. Příklad detekce mutace *IDH1/2*

Hodnota	Vzorek 1	Vzorek 2
C_T Total <i>IDH1/R132</i>	26.39	26.32
C_T <i>IDH1/R132</i> Mut	33.86	28.29
ΔC_T <i>IDH1/R132</i> Mut	7.47	1.97
C_T Total <i>IDH2/R172</i>	26.79	25.79
C_T <i>IDH2/R172</i> Mut	35.13	35.21
ΔC_T <i>IDH2/R172</i> Mut	8.34	9.42
C_T Total <i>IDH1/R100</i>	27.20	27.37
C_T <i>IDH1/R100</i> Mut	33.83	33.76
ΔC_T <i>IDH1/R100</i> Mut	6.63	6.39
Detekce mutace	Mutace nedetekována	Detekována mutace R132

Tabulka 11. Příklad identifikace mutace *IDH1/2*

Hodnota	Vzorek 1	Vzorek 2
C_T Total <i>IDH1/R132</i>	26.39	26.32
C_T <i>IDH1</i> Mut R132H	33.82	28.27
ΔC_T <i>IDH1</i> Mut R132H	7.43	1.95
C_T Total <i>IDH1/R132</i>	26.39	26.32
C_T <i>IDH1</i> Mut R132C	37.94	40.00
ΔC_T <i>IDH1</i> Mut R132C	11.55	13.68
C_T Total <i>IDH2/R172</i>	26.79	25.79
C_T <i>IDH2</i> Mut R172K	40.00	40.00
ΔC_T <i>IDH2</i> Mut R172K	13.21	14.21
Identifikace mutace	Mutace nedetekována	Detekována mutace pro R132H

Interpretace mutací *IDH1/2*

Postup použitý k přiřazení typu mutace *IDH1/2* k pozitivním vzorkům mutace *IDH1/2* je uveden v Tabulce 12. Příklad interpretace je znázorněn v Tabulce 13.

Tabulka 12. Průvodce interpretací

		Identifikace mutace			
		<i>IDH1</i> Mut R132H detekována	<i>IDH1</i> Mut R132C detekována	<i>IDH2</i> Mut R172K detekována	Mutace nedetekována
Detekce mutace	Detekována mutace R132	Detekována mutace R132H	Detekována mutace R132C	–	Mutace R132, ale ne R132H ani R132C
	Detekována mutace R172	–	–	Detekována mutace R172K	Mutace R172, ale ne R172K
	Detekována mutace R100	–	–	–	R100
	Mutace nedetekována	Detekován nízký obsah mutace R132H (mezi 1% a 2%)*	Detekován nízký obsah mutace R132C (mezi 1% a 4%)*	Detekován nízký obsah mutace R172K (přibližně 1%)*	Mutace nedetekována

* Tyto případy se mohou vyskytnout zřídka a měly by být zkontrolovány všechny vzorky a kritéria technického přijetí, zejména obsah nádorových buněk. Pokud jsou splněna všechna kritéria, měl by být vzorek znovu přetestován.

Tabulka 13. Příklad reportování a interpretace mutace *IDH1/2*

	Vzorek 1	Vzorek 2
Detekce mutace	Mutace nedetekována	Mutace R132 nedetekována
Identifikace mutace	Mutace nedetekována	Mutace R132H detekována
Výsledek interpretace	Mutace nedetekována, ani neidentifikována	Mutovaný R132H

Poznámka: Pokud má vzorek 2 nebo více hodnot ΔC_T , které jsou menší nebo rovné mezním hodnotám ΔC_T , je mutační stav přiřazen mutaci s největším rozdílem mezi mezní hodnotou a získanou hodnotou ΔC_T , viz příklad v Tabulce 14.

Tabulka 14. Příklad interpretace v případě několika pozitivních výsledků

	Vzorek 3	Vzorek 4
ΔC_T IDH1/R132 Mut	1.24	5.24
ΔC_T cutoff IDH1/R132 Mut	5.34	5.34
$(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ IDH1/R132 Mut	4.10	0.10
ΔC_T IDH2/R172 Mut	5.32	5.95
ΔC_T cutoff IDH2/R172 Mut	6.42	6.42
$(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ IDH2/R172 Mut	1.10	0.47
Výsledek interpretace	Mutovaný R132	Mutovaný R172

Řešení problémů

Tento návod k odstraňování problémů může pomoci při řešení jakýchkoli problémů, které mohou vzniknout. Další informace naleznete na adrese www.qiagen.com.

Komentáře a návrhy

Ucpaná kolonka během izolace DNA

Nekompletní lyze

Opakujte centrifugaci.

Zbývající lyzát může být přenesen na novou kolonku.

Opakujte izolaci s menším množstvím FFPE tkáně.

Nedostatek DNA ve vyizolovaném eluátu

Nedostatečná oblast
FFPE tkáně

Opakujte izolaci s více FFPE tkáňovými řezy.

Kontrola IDH1/2 WT nebyla detekována

a) Chyba pipetování nebo
vynechání reagensů;
zkumavek nebo záměna
jamek

Zkontrolujte pipetovací schema a nastavení reakce.

Opakujte běh PCR.

b) Nesprávné skladování
součástí soupravy

Soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte při -15°C to -30°C a chraňte směsi primerů a prób před světlem. Viz sekce "Skladování a práce s reagensy", strana 13.

Nepřekračujte maximum 5 cyklů rozmrazení/zamrazení.

Komentáře a návrhy

- c) Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit s prošlou dobou expirace
Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace (uvedeno na štítcích) reagensů a pokud je to nutné použijte novou soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Pozitivní kontrola *IDH1/2* nebyla detekována

- a) Chyba pipetování nebo vynechání reagensů; zkumavek nebo záměna jamek
Zkontrolujte pipetovací schema a nastavení reakce. Opakujte běh PCR.
- b) Nesprávné skladování součástí soupravy
Soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte při -15°C to -30°C a chraňte směsi primerů a prób před světlem. Viz sekce “Skladování a práce s reagensy”, strana 13.
Nepřekračujte maximum 5 cyklů rozmrazení/zamrazení.
- c) Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit s prošlou dobou expirace
Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace (uvedeno na štítcích) reagensů a pokud je to nutné použijte novou soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Žádný signál, včetně signálu kontrol

- a) Pozice 1 bez reakční zkumavky v přístroji Rotor-Gene Q MDx
Ujistěte se, že vždy vložíte vzorek na pozici 1 v rotoru. V opačném případě neprovede přístroj kalibraci a budou odečítána nesprávná fluorescenční data.
- b) Chyba pipetování nebo vynechání reagensů;
Zkontrolujte pipetovací schéma a nastavení reakce.

Komentáře a návrhy

- | | |
|--|---|
| zkumavek nebo záměna jamek | Opakujte běh PCR. |
| c) Nesprávné skladování součástí soupravy | Soupravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte při -15°C to -30°C a chraňte směsi primerů a prób před světlem, viz sekce “Skladování a práce s reagensy”, strana 13.

Nepřekračujte maximum 5 cyklů rozmrazení/zamrazení. |
| d) Souprava <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit s prošlou dobou expirace | Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace (uvedeno na štítcích) reagensů a pokud je to nutné použijte novou soupravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |
| e) Vybrán nesprávný detekční kanál | Nastavte detekční kanál na cyklování v Zeleném kanálu nebo 530 nm/640 nm. |
| f) Nebyla naprogramována akvizice dat | Zkontrolujte program cyklování, viz. Tabulka 5, strana 23.

Vyberte režim akvizice na Single na konci každého segment anealingu PCR program. |

Intenzita fluorescence kolísá

- | | |
|--|---|
| Chyba pipetování nebo vynechání reagensů; zkumavek nebo záměna jamek | Zkontrolujte pipetovací schéma a nastavení reakce.

Opakujte běh PCR. |
|--|---|

Intenzita fluorescence je příliš nízká

Komentáře a návrhy

- a) Nesprávné skladování součástí soupravy
- Soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte při -15°C to -30°C a chraňte směsi primerů a prób před světlem. Viz sekce “Skladování a práce s reagensii”, strana 13.
- Nepřekračujte maximum 5 cyklů rozmrazení/zamrazení.
- b) Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit s prošlou dobou expirace
- Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace (uvedeno na štítcích) reagensii a pokud je to nutné použijte novou soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- c) Příliš nízké množství vstupní DNA
- Před započítím práce vždy zkontrolujte koncentraci, viz. “Extrakce a příprava DNA”, strana 16.

Negativní kontrola s vodou (H₂O) vykazuje pozitivní výsledek

Křížová kontaminace, kontaminace reagensii, chyba přístroje, záměna jamek nebo kapilár nebo degradace próby

Vyměňte všechny klíčové reagensie nebo použijte novou soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Vždy zacházejte se vzorky, součástmi soupravy a spotřebním materiálem v souladu s dobrou laboratorní praxi, abyste předešli riziku křížové kontaminace.

Směsi primerů a prób chraňte před světlem.

Zkontrolujte falešně pozitivní fluorescenční křivky.

Zkontrolujte nastavení reakce, viz. “Protokol: Detekce mutací *IDH1/2*”, strana 19.

Kontrola kvality

V souladu s certifikovaným systémem řízení jakosti společnosti QIAGEN je každá šarže soupravy IDH1/2 RGQ PCR Kitu testována na základě předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu. Certifikáty analýzy jsou k dispozici na vyžádání na adrese www.qiagen.com/support/.

Omezení

Souprava je určena pro odborné použití.

Výrobek smí používat pouze odborníci, kteří jsou speciálně instruováni a vyškoleni v technikách molekulární biologie a obeznámeni s touto technologií.

Tato souprava by měla být použita dle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovaným přístrojem uvedeným v ověřeném nástrojem uvedeným v sekci “Materiál, který není součástí soupravy”, strana 10.

Pozornost by měla být věnována datům expirace vytištěným na krabici a štítcích všech součástí. Nepoužívejte expirované součásti.

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je validována pouze pro pufrované formalinem fixované, v parafínu zalité tkáň (FFPE) z mozkové tumorové tkáňě.

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je validována pouze pro použití se soupravami QIAamp DNA FFPE Tissue Kit nebo QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Pouze přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (pro PCR) a QIASymphony SP (pro přípravu vzorku) byly validovány.

Jakékoli používání tohoto produktu mimo určení a/nebo modifikace součástí soupravy budou mít za následek neplatnost odpovědnosti společnosti QIAGEN.

Je odpovědností uživatele validace systému pro všechny postupy používané ve své laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích výkonnosti QIAGEN.

Test je určen pro detekci 7 mutací v kodonech 132 a 100 genu *IDH1* a 5 mutací v kodonu 172 genu *IDH2*. Vzorky s výsledky reportovanými jako "mutace nedetekována" mohou obsahovat mutace *IDH1* nebo *IDH2*, které nebyly detekovány testem.

Detekce mutací je závislá na integritě vzorku, na obsahu nádoru a na amplifikaci DNA přítomné ve vzorku.

Jakékoli diagnostické výsledky generované tímto produktem musí být interpretovány v kontextu všech relevantních klinických nebo laboratorních nálezů.

Výkonnostní charakteristiky

Limit blanku (LOB)

Limit blanku (LOB) byl stanoven (dle směrnice CLSI/NCCLS EP17-A; 14) na negativních vzorcích (FFPE normální mozek, 8 vzorků, 64 měření/šarže, 2 šarže).

Výsledky LOB jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15. Limit blanku (LOB)

Assay	LOB	Finální LOB
R132 Mut	Validace šarže 1: 6.57 Validace šarže 2: 6.32	6.32
R132H Mut	Validace šarže 1: 7.91 Validace šarže 2: 8.22	7.91
R132C Mut	Validace šarže 1: 8.04 Validace šarže 2: 8.20	8.04
R172 Mut	Validace šarže 1: 7.74 Validace šarže 2: 7.59	7.59
R172K Mut	Validace šarže 1: 9.93 Validace šarže 2: 10.58	9.93
R100 Mut	Validace šarže 1: 6.52 Validace šarže 2: 5.19	5.17

Limit detekce (LOD)

Limit detekce (LOD nebo analytická senzitivita) byly stanoveny na základě “přístupu přesného profilování” popsaného ve směrnici CLSI/NCCLS EP17-A (14). Pro každou mutaci bylo použito pět nízko pozitivních vzorků (plazmidová DNA vázaná do wild-type DNA gliomu) (30 až 110 měření na typ mutace a procenta mutace).

Výsledky LOD jsou uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16. Limit detekce (LOD)

Assay	Mutace	LOD	Mezní hodnota assaye	Senzitivita (%)
R132H Mut	R132H	6.87	6.87	0.78
R132C Mut	R132C	7.14	7.14	1.19
R172K Mut	R172K	8.49	8.49	0.61
R132 Mut	R132H	5.50	5.34	2.32
	R132C	5.34		4.35
	R132L	5.42		2.30
	R132G	5.61		2.23
	R132S	5.42		2.75
	R132V	5.56		2.24
R172 Mut	R172K	6.42	6.42	1.06
	R172G	6.58		3.00
	R172M	6.66		3.31
	R172S	6.42		14.93
	R172W	6.68		2.36
R100 Mut	R100Q	4.65	4.65	3.45

Mutace je detekována pokud je ΔC_T nižší nebo rovna LOD.

Efekt vstupní DNA

DNA byla izolována ze 4 různých vzorků gliomů: 2 s wild-type *IDH1/2* a 2 nesoucí mutaci *IDH1* R132H (395G>A).

Pro vyhodnocení dopadu vstupního množství DNA na kvalitativní výsledky byly testovány tři různá množství DNA (včetně doporučeného v protokolu). Výsledky ukázaly, že vstupní množství DNA nemá žádný vliv na kvalitativní výsledky. Byla však pozorována technická selhání (chyba C_T Total QC) pro vstupní množství DNA nižší než je doporučeno (<25 ng DNA). V důsledku toho se doporučuje vstupní množství 25 ng DNA v objemu 5 μ l k provedení testu.

Opakovatelnost a reproducibilita

Studie pro stanovení přesnosti byla provedena na 4 různých vzorcích (plazmidová DNA zanesená do DNA wild-type gliomu (WT), mutantní a hraniční vzorek), vše bylo testováno 40x v duplikátech (n = 80 měření).

Standardní odchylky (SD) a variační koeficienty (CV) jsou znázorněny v Tabulce 17.

Tabulka 17. Přesnost výsledků

Assay	Vzorek	Průměr ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	CV_{Total} (%) [‡]	Úroveň správnosti
R132C Mut	WT	11.58	1.08	0.00	1.11	10	100% (78/78)
	5%	5.19	0.26	0.23	0.46	9	100% (76/76)
	10%	4.37	0.27	0.14	0.48	11	100% (78/78)
	30%	2.62	0.20	0.21	0.46	18	100% (78/78)
R132H Mut	WT	10.87	1.48	0.00	1.48	14	100% (78/78)
	5%	4.46	0.27	0.05	0.31	7	100% (78/78)
	10%	3.57	0.28	0.14	0.31	9	100% (76/76)
	30%	1.86	0.21	0.20	0.30	16	100% (72/72)
R172K Mut	WT	12.20	0.31	0.17	0.39	3	100% (66/66)
	5%	6.19	0.50	0.00	0.63	10	100% (76/76)
	10%	5.23	0.32	0.20	0.48	9	100% (76/76)
	30%	3.68	0.18	0.11	0.36	10	100% (76/76)

* R: Opakovatelnost.

† Běh: Opakovatelnost mezi jednotlivými běhy.

‡ Total: Celková přesnost (včetně mezi-přístrojové, mezi-operátorové a mezi šaržemi).

Tabulka pokračuje na další straně

Tabulka 17. Přesnost výsledků (pokračování)

Assay	Vzorek	Průměr ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	CV _{Total} (%) [‡]	Úroveň správnosti
R100 Mut	WT	7.21	0.41	0.27	0.52	7	100% (70/70)
	5%	3.68	0.27	0.16	0.33	9	100% (76/76)
	10%	2.93	0.24	0.15	0.32	11	100% (76/76)
	30%	1.56	0.25	0.07	0.26	17	100% (76/76)
R132 Mut	WT	8.01	0.76	0.00	0.78	10	100% (152/152)
	R132H 5%	4.29	0.30	0.15	0.48	11	99% (151/152)
	R132C 5%	4.44	0.30	0.00	0.56	13	
	R132H 10%	3.49	0.27	0.22	0.46	13	99% (151/152)
	R132C 10%	3.69	0.27	0.23	0.53	14	
	R132H 30%	1.87	0.21	0.02	0.33	18	100% (152%/152)
R132C 30%	2.00	0.26	0.28	0.59	29		

* R: Opakovatelnost.

† Běh: Opakovatelnost mezi jednotlivými běhy.

‡ Total: Celková přesnost (včetně mezi-přístrojové, mezi-operátorové a mezi šaržemi).

Tabulka pokračuje na další straně

Tabulka 17. Přesnost výsledků (pokračování)

Assay	Vzorek	Průměr ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	CV _{Total} (%) [‡]	Úroveň správnosti
R172 Mut	WT	9.47	0.91	0.87	1.45	15	100% (66/66)
	5%	4.45	0.35	0.12	0.56	13	100% (76/76)
	10%	3.55	0.29	0.02	0.53	15	100% (76/76)
	30%	2.05	0.18	0.15	0.47	23	100% (76/76)

* R: Opakovatelnost.

† Běh: Opakovatelnost mezi jednotlivými běhy.

‡ Total: Celková přesnost (včetně mezi-přístrojové, mezi-operátorové a mezi šaržemi).

Metody srovnání

Porovnání s imunohistochemickou (IHC) metodou pro detekci *IDH1/R132H*.

Provedená studie demonstrovala shodu mezi stavem mutace, ohodnoceným pomocí soupravy *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* a IHC (Anti-human *IDH1R132H* antibody clone H09, DIANOVA).

Celkem 103 klinických vzorků gliomů bylo vybráno pro testování. Nejstarší bloček byl 10 let starý.

Všechny vzorky prošly kontrolou kvality jak pro *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* and IHC.

Výsledky prokázaly pozitivní procentuální shodu (PPA) ve výši 100%, zápornou procentuální shodu (NPA) 98% a celkovou shodu (OA) 99% (Tabulka 18).

Tabulka 18. Analýza shod mezi theascreen RGQ PCR Kit a IHC

Měření shody	Frekvence (%)	95% interval spolehlivosti
PPA	45/45 (100%)	[92;100]
NPA	57/58 (98%)	[91;100]
OA	102/103 (99%)	[96;100]

Porovnání s obousměrným sekvenováním

Provedená studie demonstrovala shodu mezi stavem mutace, ohodnoceným pomocí soupravy *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* a obousměrným sekvenováním.

Celkem 103 klinických vzorků gliomů bylo vybráno pro testování. Nejstarší bloček byl 10 let starý.

Všech 103 vzorků prošlo kontrolou kvality pro *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* a 101 vzorků bylo možné vyhodnotit použitím obousměrného sekvenování.

Výsledky prokázaly pozitivní procentuální shodu (PPA) ve výši 100%, zápornou procentuální shodu (NPA) 92% a celkovou shodu (OA) 96% (Tabulky 19 a 20).

Tabulka 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit vs. obousměrné sekvenování

		Sangerovou obousměrné sekvenování				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT
therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172†	0	0	0	0	1
	WT	0	0	0	0	47

* R132 znamená, že vzorek obsahoval mutaci R132, ale nebyla to ani R132H, ani R132C.

† R172 znamená, že vzorek obsahoval mutaci R172, ale nebyla to R172K.

Tabulka 20. Analýza shody s obousměrným sekvenováním

Měření shody	Frekvence (%)	95% interval spolehlivosti
PPA	50/50 (100%)	[93;100]
NPA	47/51 (92%)	[81;97]
OA	97/101 (96%)	[90;98]

Reference

1. Louis, D.N. et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97.
2. Parsons, D.W. et al. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807.
3. Yan, H. et al. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* **360**, 765.
4. Hartmann, C. et al. (2009) Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* **118**, 469.
5. Ichimura, K. et al. (2009) IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-oncology* **11**, 341.
6. Von Deimling, A., Korshunov, A., and Hartmann, C. (2011) The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol.* **21**, 74.
7. Hartmann, C. et al. (2010) Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* **120**, 707.
8. Sanson, M. et al. (2009) Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4150.

-
9. Houillier, C. et al. (2010) IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* **75**, 1560.
 10. Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009) IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am. J. Pathol.* **174**, 1149.
 11. Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009) IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6002.
 12. Weller, M. et al. (2009) Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5743.
 13. Riemenschneider, M.J., Jeuken, J.W.M., Wesseling, P., and Reifenberger, G. (2010) Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* **120**, 567.
 14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP17-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symbols

Následující tabulka popisuje symboly, které se mohou objevit na štítcích nebo v tomto dokumentu..



<N>

Obsahuje reagentie dostačující pro <N> reakcí



Použitelné do



In vitro diagnostický zdravotnický prostředek



Katalogové číslo



Číslo šarže



Materiálové číslo (tj. označení součásti)



Komponenty (tj. seznam součástí soupravy)



Obsahuje (obsah)



Počet (tj., vialky, lahvičky)

Rn

R je revize příručky a n je číslo revize



Globálně jedinečné číslo pro obchodní položky (Global Trade Item Number)



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití



Upozornění

Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	Pro 20 reakcí: Směs 9 primerů a prób, WT kontrola, pozitivní kontrola, Master Mix, voda bez nukleáz	873011
Rotor-Gene Q MDx a příslušenství		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cykler a analyzátor pro meltingovou analýtu s vysokým rozlišením s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, crimson) plus HRM kanál, laptop, software, příslušenství, 1 rok záruka na součástky, instalace a zaškolení	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cykler a analyzátor pro meltingovou analýtu s vysokým rozlišením s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, crimson) plus HRM kanál, laptop, software, příslušenství, 1 rok záruka na součástky, instalace	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml zkumavky	Hliníkový bloček pro manuální přípravu reakcí pomocí jednokanálové pipety v 72 x 0.1 ml zkumavkách	9018901
Stripové zkumavky s víčky, 0.1ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s víčky pro 1000 reakcí	981103
Stripové zkumavky s víčky, 0.1ml (2500)	10 x 250 stripů po 4 zkumavkách s víčky pro 10,000 reakcí	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — pro izolaci genomické DNA z parafinem zalitých tkání		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pro 50 DNA izolací: 50 QIAamp MinElute® kolonek, Proteináza K, Pufry, Sběrné zkumavky (2 ml)	56404

Produkt	Obsah	Kat. č.
QIASymphony DSP DNA Mini Kit — pro automatizovanou izolaci DNA z 1–96 vzorků		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Pro 192 izolací z 200 µl: obsahuje 2 reagenční kazety a enzymové stojánky a příslušenství	937236
QIASymphony SP a příslušenství		
QIASymphony SP System	QIASymphony sample prep modul: zahrnuje instalaci a zaškolení, 1 rok záruku na součásti přístroje	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony sample prep modul: zahrnuje 1 rok záruku na součástky	9001297
Sample Prep Cartridge, 8-well (336)	8-jamkové sample prep kazety pro použití s přístrojem QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers pro použití s QIASymphony SP	997004
Špičky s filtrem 200 µl, Qsym SP (1024)	Jednorázové špičky s filtrem, ve stojáncích: (8 x 128). Pro použití s přístroji QIAcube a QIASymphony SP/AS	990332
Špičky s filtrem, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Jednorázové špičky s filtrem, ve stojáncích: (8 x 128). Pro použití s přístrojem QIASymphony SP/AS	997024
Eluční mikrozkuřavky CL (24 x 96)	Nesterilní polypropylenové zkuřavky (0.85 ml maximální kapacita, méně než 0.7 ml kapacity na skladování, 0.4 ml eluční kapacity); 2304 ve stojáncích po 96; obsahuje i stripová víčka	19588
Reagents		
RNáza A (17,500 U)	2.5 ml (100 mg/ml; 7000 units/ml)	19101
Puřr ATL (200 ml)	200 ml lyzačního puřru pro tkáň pro 1000 izolací	19076

Aktuální licenční informace a právní doložky specifické pro produkty viz příslušný manuál soupravy QIAGEN nebo uživatelská příručka. Manuály souprav QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách **www.qiagen.com** nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Tato stránka je úmyslně prázdná

Tento produkt je určen pro diagnostické použití in vitro. Produkty QIAGEN nesmí být bez dalšího písemného souhlasu společnosti QIAGEN dále prodány, upraveny pro další prodej nebo použity k výrobě komerčních produktů.

Informace v tomto dokumentu mohou být změněny bez předchozího upozornění. QIAGEN nenese žádnou odpovědnost za chyby, které se mohou v tomto dokumentu objevit. Tento dokument je považován za úplný a přesný v době publikování. V žádném případě nebude společnost QIAGEN odpovědná za náhodné, zvláštní, násobné nebo následné škody vzniklé v souvislosti s používáním tohoto dokumentu nebo vyplývající z použití tohoto dokumentu.

Výrobky společnosti QIAGEN jsou oprávněny splnit stanovené požadavky. Jediný závazek společnosti QIAGEN a jediný oprávný prostředek zákazníka jsou omezeny na bezplatnou výměnu produktů v případě, že produkty selhávají podle záruky.

Nákup tohoto produktu umožňuje kupujícímu, aby jej použil k provádění diagnostických služeb pro lidskou diagnostiku in vitro. Žádný obecný patent nebo jiný jiný druh licence, než je toto konkrétní užívací právo k nákupu, se uděluje tímto.

IDH1/2 mutace a jejich použití jsou chráněny patentovými právy, včetně evropských patentových přihlášek EP2326735 a EP2546365, US patentových přihlášek US2011229479 a US2012202207 a zahraničních protějšků.

Nákup tohoto produktu neposkytuje žádné právo na jeho použití v klinických studiích pro léčiva IDH1 / 2 cílené. QIAGEN vyvíjí specifické licenční programy pro takové použití. Kontaktujte naše právní oddělení na adrese idhlicenses@qiagen.com.

Ochranné známky: QIAGEN®, QIAamp®, QIASymphony®, MinElute®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM™ (Life Technologies Corporation); Histolemon™ (Carlo Erba); Sarstedt® (Sarstedt AG).

Limitovaná licenční smlouva pro sadu IDH1 / 2 RGQ PCR Kit

Použití tohoto produktu znamená souhlas kupujícího nebo uživatele produktu s následujícími podmínkami:

1. Výrobek lze používat výhradně v souladu s protokoly dodanými s výrobkem a touto příručkou a pro použití s komponentami obsaženými v kitu. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci z jakéhokoli svého duševního vlastnictví k používání nebo zabudování přiložených součástí této sady s jakýmkoliv komponenty, které nejsou součástí této sady, s výjimkou popsanych v protokolech dodaných s produktem, této příručky a dalších protokolů dostupných na adrese www.qiagen.com. Některé z těchto dodatečných protokolů byly poskytnuty uživateli QIAGENU pro uživatele QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány nebo optimalizovány. Společnost QIAGEN jim nezaručuje ani zaručuje, že neporušují práva třetích stran.
2. Kromě výslovně uvedených licencí společnost QIAGEN neposkytuje žádnou záruku, že tato sada a / nebo její použití neporušují práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány pro jednorázové použití a nesmějí být znovu použity, renovovány ani dále prodány.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoli jiné, vyjádřené nebo implicitní licence, než které jsou výslovně uvedeny.
5. Odběratel a uživatel sady souhlasí s tím, že nikomu jinému nepřijme nebo neschválí žádné kroky, které by mohly vést nebo usnadnit jakékoli zakázané činnosti. Společnost QIAGEN může uplatňovat zákazy této omezené licenční smlouvy u jakéhokoli soudu a bude vymáhat veškeré své vyšetřovací a soudní náklady, včetně poplatků za právní zastoupení, při jakýchkoli opatřeních k prosazení této omezené licenční smlouvy nebo jakéhokoli práva k duševnímu vlastnictví souvisejícímu s balíčkem a / nebo jeho součástí.

Pro aktuální licenční podmínky navštivte www.qiagen.com.

HB-1566-004 1075247 154034217 08/2016

© 2013–2016 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

