

ipsogen[®] IDH1 RGQ PCR Kit

Gebrauchsanweisung

IVD

Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik

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

Zur Verwendung mit dem QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit

Diese Gebrauchsanweisung gilt für:

**REF****Version***ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit

24 Proben

675223

Version 1



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

Inhaltsverzeichnis

1. Verwendungszweck	4
2. Vorgesehene Anwender	5
3. Beschreibung und Prinzip	6
3.1. Zusammenfassung und Erläuterung	6
3.2. Verfahrensprinzip	7
3.3. Plattform und Software	10
4. Im Lieferumfang enthaltene Materialien	12
4.1. Kit-Inhalt	12
4.2. Bestandteile des Kits	13
5. Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	15
5.1. Zusätzliche Reagenzien	15
5.2. Verbrauchsmaterialien	15
5.3. Ausstattung	15
6. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	17
6.1. Warnhinweise	17
6.2. Sicherheitshinweise	17
6.3. Vorsichtsmaßnahmen	18
7. Entsorgung	21
8. Lagerung und Handhabung	22
8.1. Lagerung und Handhabung der Reagenzien	22
8.2. Lagerung und Handhabung der Proben	23
9. Protokoll: Probenvorbereitung	25
10. Protokoll: IDH1-Mutationsnachweis	28
10.1. Vorbereitende Schritte	29
11. Interpretation der Ergebnisse	51
12. Anwendungseinschränkungen	59
13. Leistungsmerkmale	61
13.1. Analytische Leistung	61
13.2. Klinische Leistung	74

13.3. Klinischer Nutzen/klinische Wirksamkeit des ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit bei der Behandlung mit TIBSOVO in Kombination mit Azacitidin bei neu diagnostizierter AML	76
13.4. Klinische Konkordanz	78
13.5. Klinische Wirksamkeit	78
13.6. Kurzbericht über Sicherheit und Leistung	81
14. Literaturangaben	82
15. Hilfe zur Fehlerbehebung	83
16. Symbole	85
17. Kontakt	87
18. Bestellinformationen	88
19. Revisionsverlauf des Dokuments	90

1. Verwendungszweck

Der *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist ein qualitativer Real-time PCR-Assay zum Nachweis von Einzelnukleotidvarianten (SNVs), die fünf IDH1-Mutationen (R132C, R132H, R132G, R132S und R132L) kodieren. Dabei wird genomische DNA verwendet, die aus frischen oder gefrorenen Proben von menschlichem Vollblut oder Knochenmarkaspirat extrahiert wurde, die in K2-EDTA-Röhrchen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) entnommen wurden.

Der Test ist als Begleitdiagnostikum vorgesehen, um Kliniker bei der Identifizierung von AML-Patienten zu unterstützen, die basierend auf dem Nachweis einer IDH1-Mutation für eine Behandlung mit TIBSOVO® (Ivosidenib) geeignet sein könnten. TIBSOVO kann in Kombination mit Azacitidin gemäß den zugelassenen Indikationen verabreicht werden. Der Test dient nicht als Entscheidungshilfe hinsichtlich der Behandlung mit Azacitidin.

Frische oder gefrorene Proben von menschlichem Vollblut oder Knochenmarkaspirat, die in K2-EDTA-Röhrchen entnommen wurden, werden manuell mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit aufbereitet.

Das QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät wird für die automatisierte Amplifikation und Detektion eingesetzt.

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist kein automatisiertes Produkt; die Analyse wird jedoch durch eine spezielle Software unterstützt.

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung verwendet werden.

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik vorgesehen.

2. Vorgesehene Anwender

Zur Verwendung mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (Kat.- Nr. 61104) im Rahmen des Verfahrens zur manuellen Isolierung und Aufreinigung genomischer DNA mittels Mikrozentrifuge.

Das Produkt darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung verwendet werden.

3. Beschreibung und Prinzip

3.1. Zusammenfassung und Erläuterung

Isocitrat-Dehydrogenase 1 ist ein Enzym, das beim Menschen durch das IDH1-Gen auf Chromosom 2 kodiert wird. Wildtyp-Isocitrat-Dehydrogenasen katalysieren die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu 2-Oxoglutarat. IDH1-Hotspot-Mutationen an R132 in IDH1 führen zu Funktionsgewinn-Mutationen (Gain-of-Function-Mutationen), die zur Bildung von D-2-Hydroxyglutarat (2HG) führen (1). 2HG ist ein Onkometabolit, der an der Hypermethylierung von DNA und Histonen beteiligt ist, was zur Deregulierung der Gentranskription und zur Blockade der Zelldifferenzierung führt (2, 3). IDH1-Mutationen treten bei hämatologischen Malignomen auf, vor allem bei AML (ca. 15–25 %) (4), aber auch bei myelodysplastischen Syndromen (MDS, ca. 2–7 %) (5, 6).

Das *ipsogen*® IDH1 RGQ PCR Kit ist ein Assay zum Nachweis und zur Identifizierung von fünf spezifischen Mutationen innerhalb von Codon 132 des IDH1-Gens (Tabelle 1).

Tabelle 1. Liste der Mutationen und COSMIC-IDs

Mutation	Basenaustausch	COSMIC-ID*
R132H	395G>A	COSV61615239
R132C	394C>T	COSV61615256
R132S	394C>A	COSV61615649
R132G	394C>G	COSV61615456
R132L	395G>T	COSV61615420

* COSMIC-IDs stammen aus dem *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (7) (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

3.2. Verfahrensprinzip

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit basiert auf dem Nachweis von fünf IDH1-Mutationen durch selektive Amplifikation in genomischer DNA (gDNA), die aus Vollblut- oder Knochenmarkaspirat (BMA)-Proben extrahiert wurde. Die allelspezifische Technologie ermöglicht einen genauen und in hohem Maße reproduzierbaren Nachweis von IDH1-Zielmutationen durch den Einsatz spezifischer Forward- und Reverse-Primer- sowie SONDENSSETS: Mutationsspezifische Primer binden selektiv an die Ziel-DNA, was die Elongation und Amplifikation in der PCR-Reaktion fördert.

Die Meldung der Ergebnisse erfolgt vollständig automatisiert. Wenn die Ergebnisse der Laufkontrollen und Proben gültig sind und die Amplifikation des Assayziels unterhalb des vordefinierten Cut-off-Schwellenwerts liegt, werden im Bericht die in jeder Probe nachgewiesenen IDH1-Mutationen angezeigt.

3.2.1. DNA-Aufreinigung

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit wurde für die Verwendung mit DNA validiert, die unter Verwendung des QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit und gemäß dem Verfahren zur manuellen Isolierung und Aufreinigung genomischer DNA mittels Mikrozentrifuge aus Vollblut- und BMA-Proben extrahiert wurde. Verwenden Sie keine anderen DNA-Extraktionsprodukte und verwenden Sie weder den QIAcube® noch Vakuumsysteme für die DNA-Extraktion mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Das manuelle Verfahren des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit mittels Mikrozentrifuge umfasst 4 Schritte. Die Proben werden zunächst unter denaturierenden Bedingungen bei erhöhten Temperaturen lysiert. Die Lyse erfolgt in Gegenwart von QIAGEN® Protease (QP) und Lysepuffer (AL). Anschließend wird jedes Lysat auf eine QIAamp Mini-Spin-Säule aufgetragen und die genomische DNA wird an die Silikamembran adsorbiert, während das Lysat durch Zentrifugalkraft durch die Säule geleitet wird. Während die genomische DNA an die

Membran der QIAamp Mini-Spin-Säule gebunden bleibt, werden Verunreinigungen mithilfe von Waschpuffern effizient entfernt. Schließlich wird die genomische DNA mit 200 µl Elutionspuffer (AE) von der Membran der QIAamp Mini Spin-Säule eluiert. Die eluierte DNA ist bereit für die Verwendung mit dem *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

3.2.2. Real-time PCR

Durch den Einsatz der Real-time PCR können Reaktionsprodukte bereits während der exponentiellen Phase des PCR-Amplifikationsprozesses nachgewiesen werden und nicht erst an dessen Ende, wie es bei der Endpunkt-PCR der Fall ist. Dies erhöht die Testspezifität und reduziert den Zeitaufwand für die Durchführung des Testverfahrens.

Der Assay bedient sich des Reaktionsprinzips der Oligonukleotid-Hydrolyse im Rahmen der Real-time PCR mit TaqMan®-Sonden. Zur Detektion jeder Ziel-Basensequenz werden drei Arten von Oligonukleotiden eingesetzt: ein Paar konventioneller PCR-Primer, die komplementär zu den Sequenzen up- und downstream der Zielsequenz sind und ein PCR-Amplifikat erzeugen, und ein zur genauen Zielsequenz komplementäres Sondenmolekül, das sowohl mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff als auch mit einem Fluoreszenz-Quencher in unmittelbarer Nähe zueinander ausgestattet ist.

Bei der PCR lagert sich die Oligonukleotidsonde an die Zielsequenz an, sofern diese vorhanden ist, während die PCR-Primer an ihre jeweiligen Komplementärsequenzen up- und downstream der Sondenbindungsregion hybridisieren. In der Primerelongationsphase der Reaktion wird das Sonden-Oligonukleotid durch die 5'–3'-Exonuklease-Aktivität der *Thermus aquaticus* (Taq-)DNA-Polymerase gespalten, wobei das fluoreszierende Reporter- und das Quencher-Molekül freigesetzt werden. Wenn diese voneinander weg in die Lösung diffundieren, verringert sich die Wirkung des Quenchers auf den Reporter, was zu einem Anstieg der nachweisbaren Fluoreszenz führt. Dieser Vorgang findet in jedem PCR-Zyklus statt und hat keinen störenden Einfluss auf die exponentielle Akkumulation des Produkts (Abbildung 1).

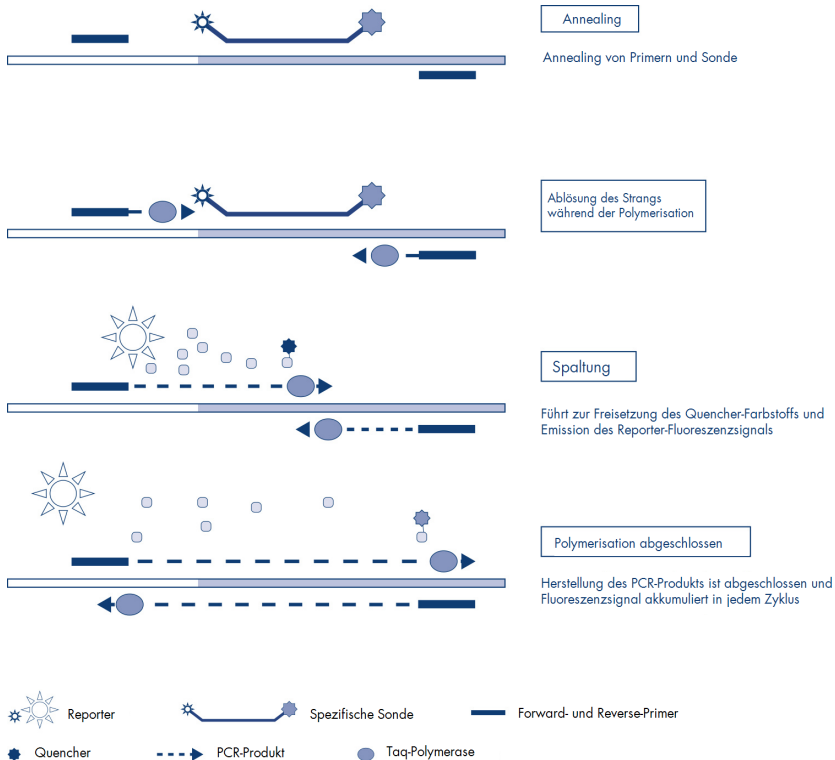


Abbildung 1. Das TaqMan Echtzeit-Reaktionsprinzip.

Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals ist nur nachweisbar, wenn die Zielsequenz, die komplementär zu beiden Primern und der Sonde ist, in der Reaktion vorhanden ist. Fehlt die Zielsequenz, erfolgt keine Spaltung der Sonde; dann erfolgt keine Dissoziation des Fluoreszenzreporters vom Quencher und folglich auch kein Anstieg der Fluoreszenz.

Die Anzahl der PCR-Zyklen, die für die Detektion eines Fluoreszenzsignals oberhalb des vordefinierten Schwellenwerts erforderlich sind, wird als Zyklusschwellenwert (Ct) bezeichnet.

Dieser Schwellenwert ist direkt proportional zur Menge der Zielsequenz, die zu Beginn der Reaktion vorliegt, und ermöglicht die Festlegung einer Sensitivitätsgrenze für den Test.

Jeder IDH1-Mutationsassay beinhaltet einen allelspezifischen Primer, der selektiv an DNA-Sequenzen bindet, die die Mutation enthalten. Eine Fehlpaarung am 3'-Ende des allelspezifischen Primers (z. B. bei Vorhandensein einer Wildtyp-Sequenz oder einer anderen Mutation) verringert die Effizienz der Primerelongation und erhöht somit die Spezifität für die Zielmutation.

Die Spezifität für IDH1-R132-Mutationen wird durch den Einsatz von PCR-Blockern weiter erhöht. Oligonukleotide, die komplementär zur Wildtyp-DNA-Sequenz sind, sind in den PCR-Reaktionsgemischen enthalten. In Gegenwart von Wildtyp-DNA hybridisieren die Oligonukleotid-Blocker selektiv an die DNA und hemmen die Erkennung von Wildtyp-Sequenzen durch mutationsallelspezifische Primer.

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit enthält HotStarTaq®-DNA-Polymerase, eine modifizierte Form der QIAGEN Taq-DNA-Polymerase. Sie wird im inaktiven Zustand geliefert und hat bei Umgebungstemperatur keine enzymatische Aktivität. Dadurch wird die Bildung von fehlerhaft geprimten Produkten und Primer-Dimeren während der Reaktionseinrichtung und des ersten Denaturierungsschritts verhindert. So werden um die Reaktanten konkurrierende PCR-Artefakte vermieden und eine hohe Spezifität der PCR ermöglicht. Das Enzym wird zu Beginn der Reaktion durch eine 15-minütige Inkubation bei 95 °C aktiviert. Der Hot Start ermöglicht die schnelle und unkomplizierte Einrichtung von Reaktionen bei Raumtemperatur.

3.3. Plattform und Software

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist speziell für die Verwendung mit folgenden Produkten konzipiert:

- Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM Platform* (Kat.- Nr. 9002032 [Plattform] oder 9002033 [System]), betrieben mit einem PC, auf dem folgende Software installiert ist:
 - Rotor-Gene AssayManager® v2.1 (Version 2.1.1 oder höher) (Kat.- Nr. 9024203)
 - Gamma Plug-in Version 1.0 (oder höher) (Kat.- Nr. 9025511)
 - *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile („AP_*ipsogen*_IDH1_Blood_BMA_V1_0_x.iap“ wobei $x \geq 0$)

Hinweis: Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile ist nur mit Rotor-Gene AssayManager v2.1 oder höher kompatibel.

Informationen zum Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät, zur Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application-Software oder zur Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in-Software finden Sie in den entsprechenden Benutzerhandbüchern.

Das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät muss gemäß den Anforderungen im Benutzerhandbuch gewartet werden.

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

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

4. Im Lieferumfang enthaltene Materialien

4.1. Kit-Inhalt

<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit			
Katalognummer			675223
Anzahl Tests			24
Reagenz	Farbe des Deckels	Röhrchen-ID	Volumen
IDH1 Reaction Mix 1 (IDH1-Reaktionsgemisch 1)	Grün	IDH1 Mix 1 (IDH1-Gemisch 1)	950 µl
IDH1 Reaction Mix 2 (IDH1-Reaktionsgemisch 2)	Lila	IDH1 Mix 2 (IDH1-Gemisch 2)	950 µl
IDH1 Positive Control (IDH1-Positivkontrolle)	Rot	PC	120 µl
Taq DNA Polymerase (Taq-DNA-Polymerase)	Mintgrün	Taq	85 µl
Water for NTC (Wasser für NTC)	Weiß	NTC	1,9 ml
Water for sample dilution (Wasser zur Probenverdünnung)	Weiß	Dil.	1,9 ml

Im Lieferumfang des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist kein Zubehör enthalten.

4.2. Bestandteile des Kits

Reagenz	Kritische(r)/aktive(r)/reaktive(r) Inhaltsstoff(e)	Konzentrationsbereich
IDH1 Reaction Mix 1 (IDH1-Reaktionsgemisch 1) und IDH1 Reaction Mix 2 (IDH1-Reaktionsgemisch 2)	Zielspezifische Oligonukleotide: Primer	0,1–1 µM
	Zielspezifische Oligonukleotide: Fluorophor-markierte Detektionssonden	0,1–1 µM
	IDH1-Oligonukleotid-PCR-Blocker	0,1–2 µM
	Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	< 1 mM
IDH1 Positive Control (IDH1-Positivkontrolle)	DNA-Plasmide mit zielspezifischen Sequenzen	< 100.000 Kopien/µl
Taq DNA Polymerase (Taq-DNA-Polymerase)	Taq DNA Polymerase (Taq-DNA-Polymerase)	1–10 Einheiten

Hinweis: Das Produkt enthält zusätzliche Komponenten, die die Messungen beeinflussen können.

4.2.1. Reaktionsgemische

IDH1-Reaktionsgemisch 1 und IDH1-Reaktionsgemisch 2 enthalten Reagenzien zur Durchführung von PCR-Reaktionen zum Nachweis der in Tabelle 1 aufgeführten IDH1-Mutationen.

In jedem Reaktionsgemisch wird zudem eine Kontrollreaktion amplifiziert, wie nachstehend beschrieben.

4.2.2. Kontrollreaktion

Bei der Kontrollreaktion werden ein Forward- und ein Reverse-Primer sowie eine markierte Sonde zum Nachweis der Amplifikation einer konservierten Nicht-IDH1-Sequenz verwendet. Anhand der Kontrollreaktion wird geprüft, ob in der Probe eine ausreichende Konzentration

von amplifizierbarer DNA vorhanden ist und in den analytischen Berechnungen zur Bestimmung des Mutationsstatus einen Faktor darstellt.

Das Kontrollziel dient sowohl zur Einstufung einer Probe als „IDH1-Mutation nachgewiesen“ oder „keine Mutation nachgewiesen“ als auch als DNA-Beladungskontrolle. Sofern dem Reaktionsröhrchen ausreichend DNA zugegeben wurde, liefern alle Proben ein Signal in der Kontrollreaktion in einem vordefinierten Ct-Bereich.

4.2.3. IDH1 Positive Control (IDH1-Positivkontrolle)

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit enthält auch die IDH1-Positivkontrolle. Die Positivkontrolle ist ein Gemisch aus DNA-Plasmiden, die alle durch das Kit nachgewiesenen Mutationen repräsentieren. Durch den Nachweis der Positivkontrolle wird bestätigt, dass jedes der Reaktionsgemische im Kit einwandfrei funktioniert.

4.2.4. Negativkontrolle

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit enthält nukleasefreies Wasser für die Kontrolle ohne Template (Röhrchen NTC) zur Verwendung in der „Kontrolle ohne Template“-Reaktion. Die Kontrolle ohne Template dient als Negativkontrolle und wird bei der Assayeinrichtung zur Erkennung möglicher Kontaminationen eingesetzt.

4.2.5. Taq DNA Polymerase (Taq-DNA-Polymerase)

Die Taq-DNA-Polymerase ist das Enzym für die Polymerase-Kettenreaktion, die im *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit zum Einsatz kommt.

4.2.6. Water for sample dilution (Wasser zur Probenverdünnung)

Bei Bedarf wird ein zusätzliches Röhrchen mit nukleasefreiem Wasser verwendet, um gDNA zu verdünnen, deren Konzentration für das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit zu hoch ist.

5. Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

5.1. Zusätzliche Reagenzien

- QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (Kat.- Nr. 61104, siehe Abschnitt „DNA-Aufreinigung“)
- DNAZap™ PCR-degradierende Lösungen oder gleichwertige Reinigungslösungen
- Distel High Level Laboratory Disinfectant und Isopropylalkohol (IPA)-Waschlösung oder eine gleichwertige Reinigungslösung

5.2. Verbrauchsmaterialien

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

5.3. Ausstattung

- Plattform und Software, wie auf Seite "Plattform und Software" auf Seite 10 beschrieben
- Permanentmarker
- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Probenvorbereitung
- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Herstellung des PCR-Master-Mix

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

- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Dispensierung von Template-DNA
- Tischzentrifuge* mit Rotor für 1,5-ml-Röhrchen
- Thermomixer*, beheizter Orbitalinkubator*, Heizblock* oder Wasserbad* zur Inkubation bei 37 °C und 56 °C
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, Aluminiumblock für die manuelle Einrichtung von Reaktionen (Kat.- Nr. 9018901)
- 72-Well-Rotor zur Aufnahme der Strip Tubes and Caps, 0.1 mL, für Reaktionsvolumen von 10–50 µl; erfordert Locking Ring 72-Well Rotor
- Locking Ring 72-Well Rotor, für Strip Tubes and Caps, 0.1 mL, im 72-Well Rotor (Kat.- Nr. 9018904)
- Gerät zur spektrophotometrischen Quantifizierung*
- Tisch-Vortexer

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

6. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Bitte beachten Sie, dass Sie bei der Meldung schwerwiegender Gerätevorkommnisse an den Hersteller und/oder seinen autorisierten Vertreter und die Aufsichtsbehörde, die für den Benutzer und/oder Patienten zuständig ist, möglicherweise Ihre lokalen Vorschriften beachten müssen.

6.1. Warnhinweise

Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik.

Zur Verwendung mit der Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Plattform.

Zur Verwendung mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit unter Anwendung des Verfahrens zur manuellen Isolierung und Aufreinigung von genomischer DNA mittels Mikrozentrifuge.

6.2. Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen sind den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (SDB) zu entnehmen. In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und jeder Kit-Komponente das jeweilige SDB als praktische und kompakte PDF, die Sie einsehen und ausdrucken können.

- Die Proben sind potenziell infektiös. Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.
- Sicherheitshinweise zum Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät finden Sie im zugehörigen Benutzerhandbuch.

- Sicherheitshinweise zum QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (Kat.- Nr. 61104) finden Sie im Handbuch zum QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Hand-book*.

6.2.1. Notfallinformationen

CHEMTREC

Außerhalb der USA und Kanadas: +1 703 527 3887

6.3. Vorsichtsmaßnahmen

Der Anwender muss bei der Verwendung des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit stets die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachten:

Taq DNA Polymerase (Taq-DNA-Polymerase)



Enthält: ethoxyliertes Nonylphenol. Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Verschüttete Mengen aufnehmen. Inhalt/Behälter unter Beachtung der örtlichen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften bei einer zugelassenen Einrichtung entsorgen.

- Der Test ist zur Verwendung mit Vollblut- oder Knochenmarkaspiratproben bestimmt, die in K2-EDTA-Röhrchen entnommen wurden.
- Alle chemischen und biologischen Materialien sind potenziell gefährlich. Die Proben sind potenziell infektiös und müssen als biologische Gefahrstoffe behandelt werden.
- Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.
- Die Reagenzien für das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit sind optimal verdünnt. Die Reagenzien dürfen nicht weiter verdünnt werden, da dies die Leistung beeinträchtigen könnte. Eine Ver-

wendung von Reaktionsvolumen (Reaktionsgemisch plus Probe) unter 25 µl wird nicht empfohlen.

- Alle Reagenzien im *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit sind speziell für die Verwendung mit den im *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit enthaltenen Tests formuliert.
- Alle im *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus demselben *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit vorgesehen. Die Reagenzien dürfen weder innerhalb eines *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit noch zwischen verschiedenen *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kits ausgetauscht werden, da dies die Leistung beeinträchtigen kann.
- Verwenden Sie ausschließlich die im *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit mitgelieferte Taq-DNA-Polymerase (Röhrchen Taq). Diese darf nicht durch die Taq-DNA-Polymerase aus anderen Kits desselben Typs oder eines anderen Typs oder durch die Taq-DNA-Polymerase anderer Hersteller ersetzt werden.
- Weitere Informationen zu Warnhinweisen, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren finden Sie im *Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform User Manual* (Benutzerhandbuch zur Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform).
- Installieren Sie das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät gemäß den Installationsverfahren und Standortanforderungen.
- Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination der Kontroll- und Reaktionsgemisch-Reagenzien mit synthetischem Material, das im Positivkontrollreagenz enthalten ist, zu vermeiden.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um Kreuzkontamination zwischen Proben zu verhindern. Verschießen Sie die Röhrchen sofort nach dem Hinzufügen der einzelnen Proben.
- Dekontaminieren Sie den Ladeblock gründlich, bevor er zur Vorbereitung der Assay-Master-Mixes benutzt wird. Es wird empfohlen, DNAZap PCR-Degradierungslösungen, gefolgt

von Distel High Level Laboratory Disinfectant und IPA-Waschlösung, zu verwenden. Der Ladeblock muss vor Gebrauch trocknen.

- Verwenden Sie für die Vorbereitung der Reaktionsgemische und die Zugabe von Positivkontrollreagenzien speziell dafür reservierte Pipetten.
- Führen Sie die Vorbereitung und Dispensierung der Reaktionsgemische in einem Bereich durch, der von dem Bereich, in dem die Positivkontrolle zugegeben wird, physisch getrennt ist.
- In den Reaktionsgemisch-Reagenzien enthaltene fluoreszenzmarkierte Moleküle sind lichtempfindlich. Kontroll- und Reaktionsgemisch-Reagenzien müssen vor Licht geschützt werden, um Photobleichung zu vermeiden.
- Öffnen Sie das Rotor-Gene Q MDx-Gerät erst, wenn der Lauf beendet ist.
- Rotor-Gene Q Röhrchen dürfen nach dem Lauf nicht geöffnet werden. Wenn während des Laufs ein Fehler aufgetreten ist, müssen die Proben im Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät entsorgt werden. Sie dürfen nicht erneut getestet werden.
- Es müssen alle Vorsichtsmaßnahmen zur Sicherstellung einer korrekten Analyse der Proben ergriffen werden, um falsches Einsetzen der Proben, Beladungsfehler und Pipettierfehler zu vermeiden.
- Zur Minimierung der Kennzeichnungen für Kontrollen und Proben ist die Gebrauchsanweisung für das ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit (*ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit Instructions for Use*) genau zu befolgen. Dies umfasst unter anderem:
 - Ein korrektes Mischen der Reagenzien ist erforderlich und muss während der Assayeinrichtung bei jedem Mischschritt sichergestellt werden.

7. Entsorgung

Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

8. Lagerung und Handhabung

8.1. Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit wird auf Trockeneis versandt und muss beim Empfang noch gefroren sein. Wenn das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit beim Empfang nicht gefroren ist, die Umverpackung während des Transports geöffnet wurde oder die Lieferung keinen Lieferschein oder keine Reagenzien enthält, wenden Sie sich bitte an den Technischen Support von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort (siehe www.qiagen.com).

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit muss unmittelbar nach dem Empfang bei -30 °C bis -15 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden. Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit muss vor Licht geschützt werden, um Photobleichung und Leistungsverlust zu vermeiden. Bei Lagerung unter den angegebenen Bedingungen ist das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit bis zu dem auf der Umverpackung aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

Unter diesen Bedingungen sind die Komponenten 11 Monate lang ohne Leistungseinbußen oder Qualitätsverlust stabil, sofern auf dem Etikett nichts anderes angegeben ist.

Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Innerhalb von maximal 90 Tagen dürfen insgesamt 3 Einfrier-/Auftauzyklen nicht überschritten werden. Die Reagenzien müssen vor dem Gebrauch für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur ($15\text{--}25\text{ °C}$) vollständig aufgetaut werden. Die Reagenzien müssen innerhalb von 4 Stunden nach der Entnahme wieder in den Gefrierschrank zurückgestellt werden.

Die Reagenzien im *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit sind optimal verdünnt, sodass vor der Verwendung zur Analyse gemäß der *ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit Gebrauchsanweisung* (diesem Dokument) keine weitere Aufreinigung oder Vorbehandlung erforderlich ist.

Hinweis: Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten aufgedruckten Verfallsdaten und Lagerungsbedingungen sind zu beachten. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

8.1.1. Stabilität nach dem Öffnen

Das Produkt nicht verwenden, wenn es außerhalb der Spezifikationen gelagert wurde, die Verpackung beschädigt wurde oder andere Anzeichen eines Verderbs oder einer Fehlfunktion erkennbar sind.

Nach dem Öffnen können die Reagenzien in der Originalverpackung 90 Tage oder bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei -30 bis -15 °C gelagert werden (je nachdem, was zuerst eintritt).

8.2. Lagerung und Handhabung der Proben

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist für die Verwendung mit frischen oder gefrorenen Proben von menschlichem Vollblut (WB) oder Knochenmarkaspirat (BMA) bestimmt, die in K2-EDTA-Röhrchen entnommen wurden.

Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln. Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

8.2.1. Entnahme und Lagerung der Proben

Vollblut- und Knochenmarkaspiratproben sollten gemäß den Empfehlungen des Herstellers in K2-EDTA-Röhrchen entnommen werden. Die Proben müssen gemäß ISO 20658:2023 transportiert werden und die nachstehend in diesem Abschnitt aufgeführten Lagerungsbedingungen (einschließlich der maximalen Anzahl an Gefrier-Auftau-Zyklen) einhalten, um die Probenqualität zu gewährleisten. Die DNA kann nach der Extraktion und vor der Untersuchung gelagert werden.

Die empfohlenen Lagerungsbedingungen für Proben sind nachstehend beschrieben:

- Im Kühlschrank bei 2–8 °C bis zu 7 Tage.
- Im Gefrierschrank bei –30 °C bis –15 °C bis zu 3 Wochen für WB- und bis zu 9 Wochen für BMA-Proben. Für WB- und BMA-Proben dürfen jeweils insgesamt zwei Gefrier-Auftau-Zyklen nicht überschritten werden.

Die empfohlenen Lagerungsbedingungen für gDNA sind nachstehend beschrieben:

- Im Kühlschrank bei 2–8 °C bis zu 2 Wochen.
- Im Gefrierschrank bei –30 °C bis –15 °C bis zu 9 Wochen.

8.2.2. Störsubstanzen in den Proben

Substanzen in Vollblut- oder Knochenmarkaspiratproben könnten die Leistung des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit beeinträchtigen.

Die Auswirkungen potenzieller Störsubstanzen wurden untersucht; weitere Einzelheiten sowie eine Liste der getesteten Substanzen finden Sie im Abschnitt „Leistungsmerkmale“. Bei folgenden Wirkstoffen wurde eine Störung beobachtet: Cytarabin, Decitabin, Etoposid, Idarubicinhydrochlorid, Daunorubicinhydrochlorid, Azacitidin und Triglyceride.

9. Protokoll: Probenvorbereitung

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“.
- Stellen Sie sicher, dass alle erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltenen Materialien verfügbar sind (siehe Seite "Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien" auf Seite 15).
- Stellen Sie sicher, dass alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien ordnungsgemäß gelagert werden und das Verfallsdatum noch nicht überschritten ist.
- Stellen Sie sicher, dass alle Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

DNA-Aufreinigung

Die DNA-Aufreinigung muss gemäß den Anweisungen für das Protokoll zur manuellen Extraktion mittels Mikrozentrifuge im *Handbuch zum QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit* durchgeführt werden.

Hinweis: Verwenden Sie 200 µl WB oder BMA für die Extraktion. Stellen Sie sicher, dass die Proben vor der Extraktion gut gemischt werden (z. B. durch Invertieren).

Hinweis: Die DNA ist mit 200 µl Elutionspuffer (AE) zu eluieren.

Hinweis: Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit wurde für die Verwendung mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit unter Anwendung des Protokolls zur manuellen Extraktion mittels Zentrifuge entwickelt. Um eine optimale Leistung zu gewährleisten, sind andere Extraktionsprodukte, -protokolle und/oder automatisierte Systeme nicht zulässig.

DNA-Quantifizierung und -Normalisierung

Aus Vollblut- oder Knochenmarkaspiratproben extrahierte gDNA sollte gemäß den örtlichen Verfahren quantifiziert werden (z. B. mit einem Gerät zur spektrophotometrischen Quantifizierung).

Hinweis: Vergewissern Sie sich, dass zur Kalibrierung des Geräts zur Quantifizierung der korrekte Elutionspuffer verwendet wird.

- Beträgt die gemessene Konzentration zwischen ≥ 1 ng/µl und ≤ 6 ng/µl, ist keine Probennormalisierung erforderlich.
- Beträgt die gemessene Konzentration weniger als 1 ng/µl, muss die Probe erneut extrahiert werden.
- Beträgt die gemessene Konzentration mehr als 6 ng/µl, muss die Probe mit dem im *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit enthaltenen Wasser zur Verdünnung (Dil.) gemäß der folgenden Formel auf 5 ng/µl verdünnt werden:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Wobei:

- C_i : Ausgangskonzentration der extrahierten gDNA
- C_f : Zu erzielende Endkonzentration = 5 ng/µl
- V_f : Zur Durchführung eines *ipsogen* IDH1 RGQ PCR-Laufs benötigtes Endvolumen (d. h. 10 µl + Zusatzvolumen für Pipettierfehler)
- V_i : Anfangsvolumen der extrahierten gDNA, das zu pipettieren und mit dem im *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit enthaltenen Wasser zur Verdünnung (Dil.) zu verdünnen ist

Hinweis: Wassermenge, die der extrahierten gDNA *hinzuzufügen ist* = $V_f - V_i$

Hinweis: Verwenden Sie das mitgelieferte Röhrchen mit Wasser zur Verdünnung (Dil.), um die Probe bei Bedarf zu verdünnen.

Rechenbeispiel

- Wenn beispielsweise eine gDNA-Konzentration von 20 ng/μl gemessen wird, kann das der gDNA hinzuzufügende Volumen wie folgt bestimmt werden:
 - $C_i = 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ [oder wie gemessen]
 - $C_f = 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ [Festwert]
 - $V_f = 15 \mu\text{l}$ [ausreichendes Volumen mit Überschuss für PCR-Reaktionen]
 - V_i wird wie folgt berechnet:

$$20 \text{ ng}/\mu\text{l} \times V_i = 5 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 15 \mu\text{l}$$

$$V_i = \frac{5 \times 15}{20} = 3,75 \mu\text{l}$$

- Die Menge des hinzuzufügenden Wassers berechnet sich wie folgt:

$$\text{Hinzuzufügende Wassermenge} = V_f - V_i = 15 - 3,75 = 11,25 \mu\text{l}$$

11,25 μl Wasser zur Verdünnung in ein geeignetes Röhrchen dispensieren. 3,75 μl gDNA-Probe hinzufügen und anschließend gründlich mischen.

10. Protokoll: IDH1-Mutationsnachweis

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“.
- Stellen Sie sicher, dass alle erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltenen Materialien verfügbar sind (siehe Seite "Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien" auf Seite 15).
- Stellen Sie sicher, dass alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien ordnungsgemäß gelagert werden und das Verfallsdatum noch nicht überschritten ist.
- Machen Sie sich vor der Durchführung des Protokolls mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät vertraut. Detaillierte Informationen finden Sie in den Benutzerhandbüchern für das Gerät, die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software und das Gamma Plug-in.
- Stellen Sie sicher, dass alle Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers überprüft und kalibriert wurden.
- Vortexen Sie die Taq-DNA-Polymerase (Taq) nicht, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.
- Pipettieren Sie die Taq-DNA-Polymerase (Taq), indem Sie die Pipettenspitze nur knapp unter die Flüssigkeitsoberfläche tauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze großflächig mit dem Enzym in Berührung kommt.
- Vor dem Start müssen die folgenden Einstellungen auf der Registerkarte „Configuration“ (Konfiguration) vorgenommen werden (Abbildung 2 und Abbildung 3).

Finish run

☐ Run has to be released before starting approval

☐ Release of run has to be signed

Abbildung 2. Stellen Sie sicher, dass die Kontrollkästchen „Run has to be released before starting approval“ (Lauf muss vor Beginn der Genehmigung freigegeben werden) und „Release of run has to be signed“ (Freigabe des Laufs muss abgezeichnet werden) nicht aktiviert sind.

Work list

Format of generated work list names

WL_20110513_0430

User-definable section

WL

☒ Date

☒ Time

☐ Operator

☒ Enable processing of unclear samples

☒ Enable checksum for LIMS import

Closed mode

☐ Material number required

☒ Valid expiry date required

☒ Lot number required

UDT mode

☐ Material number required

☐ Valid expiry date required

☐ Lot number required

Abbildung 3. Stellen Sie sicher, dass „Material number required“ (Materialnummer erforderlich) nicht aktiviert ist.

10.1. Vorbereitende Schritte

- Vor jedem Gebrauch alle Reagenzien, mit Ausnahme der Taq-DNA-Polymerase (Taq) und der Proben, mindestens 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) auftauen lassen. Zum Mischen des Inhalts 5–12 Sekunden lang vortexten, dann kurz zentrifugieren, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens absetzt. IDH1-Reaktionsgemische, PC und NTC innerhalb von 4 Stunden nach Beginn des Auftauvorgangs wieder in den Gefrierschrank (–30 °C bis –15 °C) stellen.

Hinweis: Die Taq-DNA-Polymerase (Taq) erst entnehmen, wenn die Reagenzien aufgetaut sind.

- Sicherstellen, dass die zu testenden Proben vollständig aufgetaut und gut gemischt sind.
- Die gesamte erforderliche Software herunterladen und installieren. Weitere Informationen zur Softwareinstallation finden Sie im Abschnitt „Installieren des Gamma Plug-ins und Importieren des Assay-Profils“ auf der nächsten Seite.
 - Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software (Version 2.1.1 oder höher) (Kat.- Nr. 9024203)
 - Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in v1.0 (oder höher) (Kat.- Nr. 9025511)
 - *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile

10.1.1. Installieren des Gamma Plug-ins und Importieren des Assay-Profils

Detaillierte Informationen zur Installation der Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core-Software finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application Benutzerhandbuch*.

Detaillierte Informationen zu Installation und Import des Gamma-Plug-ins und des Assay-Profils finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application Benutzerhandbuch*.

1. Laden Sie das Gamma-Plug-in von der QIAGEN-Website (www.qiagen.com) herunter.
2. Starten Sie die Installation, indem Sie auf die Datei `RGAM_V2_1_Gamma__Plug-in.Installation.v1_0_x.msi` (wobei $x \geq 0$ ist) doppelklicken und die Installationsanweisungen befolgen. Detaillierte Informationen hierzu finden Sie im Abschnitt „Installing Plug-ins“ (Installieren von Plug-ins) im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application Benutzerhandbuch*.

3. Nach der erfolgreichen Installation des Plug-ins muss eine Person mit Administratorrechten für die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software die neueste Version des Assay-Profiles wie folgt importieren:
 - a. Öffnen Sie die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software, indem Sie auf das unten stehende Symbol klicken.



Das folgende Fenster wird geöffnet:

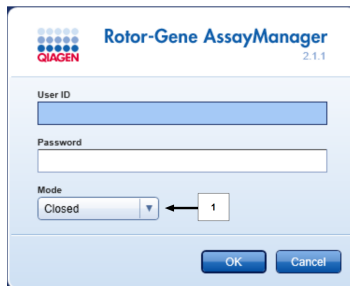


Abbildung 4. Rotor-Gene AssayManager V2.1.

- b. Melden Sie sich mit Ihrer Benutzer-ID und Ihrem Passwort bei der Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software an. Der Modus „Closed“ (Geschlossen) darf nicht geändert werden. Klicken Sie auf **OK**. Das folgende Fenster wird geöffnet:

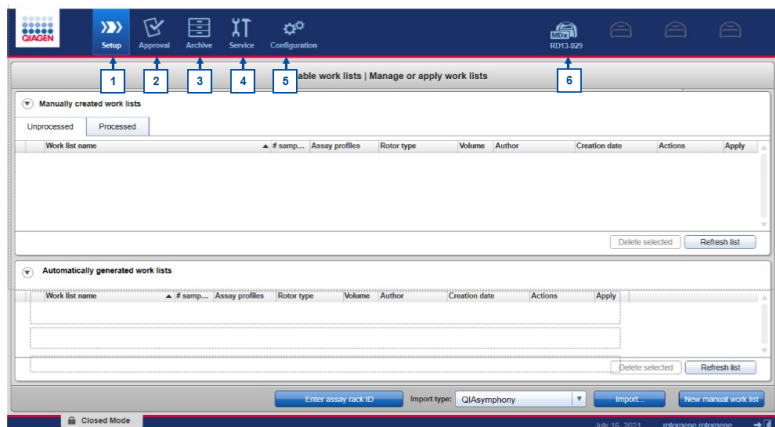
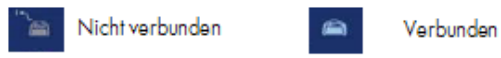


Abbildung 5. Rotor-Gene AssayManager v2.1.1. 1: Registerkarte „Setup“. Diese Registerkarte ermöglicht die Verwaltung und Anwendung von Arbeiten. **2: Registerkarte „Approval“.** Diese Registerkarte ermöglicht die Suche nach vorherigen Experimenten. **3: Registerkarte „Archive“.** Diese Registerkarte ermöglicht die Suche nach alten Experimenten, die bereits genehmigt wurden. **4: Registerkarte „Service“.** Auf dieser Registerkarte wird ein Audit-Trail jeder mit der Software generierten Datei angezeigt. **5: Registerkarte „Configuration“.** Diese Registerkarte ermöglicht die Konfiguration aller Softwareparameter. **6: Rotor-Gene Q (RGQ)-Symbol.**



- c. Wählen Sie die Umgebung „Configuration“ (Konfiguration) aus.
- d. Wählen Sie die Registerkarte **Assay Profiles** (Assay-Profile) aus.
- e. Klicken Sie auf **Import** (Importieren).
- f. Wählen Sie das zu importierende Assay-Profil im Dialogfenster aus und klicken Sie dann auf **Open** (Öffnen).
- g. Nach dem erfolgreichen Import des Assay-Profiles kann es in der Umgebung „Setup“ (Einrichtung) verwendet werden.

Hinweis: Es ist nicht möglich, die gleiche Version eines Assay-Profiles erneut zu importieren.

10.1.2. Verfahren

1. Vor dem Gebrauch alle Reagenzien, mit Ausnahme der Taq-DNA-Polymerase (Taq), mindestens 30 Minuten und höchstens 2 Stunden lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) auftauen lassen.

Hinweis: Die Taq-DNA-Polymerase (Taq) erst entnehmen, wenn die Reagenzien aufgetaut sind.

Hinweis: IDH1-Reaktionsgemische, PC und NTC innerhalb von 4 Stunden nach Beginn des Auftauvorgangs wieder in den Gefrierschrank (–30 °C bis –15 °C) stellen.

Hinweis: Es wird empfohlen, IDH1-Reaktionsgemische und Taq unmittelbar nach der Herstellung der Master-Mixe wieder in den Gefrierschrank (–30 °C bis –15 °C) zu stellen.

2. Alle Reagenzien, mit Ausnahme von Taq, durch 5–12 Sekunden langes Vortexen mischen, um lokale Salzkonzentrationen zu vermeiden, dann kurz zentrifugieren, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens absetzt.

Hinweis: Die Taq-DNA-Polymerase (Taq) darf nicht gevortext werden.

Hinweis: Die Gesamtzeit zwischen Beginn der PCR-Einrichtung und Beginn des Laufs sollte 2 Stunden nicht überschreiten:

3. Setzen Sie gemäß den Volumenangaben in Tabelle 3 und Tabelle 4 ausreichend Master-Mixe (IDH1-Reaktionsgemische plus Taq-DNA-Polymerase [Taq]) für die DNA-Proben, eine Positivkontrollreaktion und eine „Kontrolle ohne Template“-Reaktion an.

Hinweis: Planen Sie Reagenzien für $n + 2$ zusätzliche Proben ein, damit bei der PCR-Einrichtung ausreichend Material vorhanden ist.

Hinweis: Die maximale Anzahl von Läufen bei Verwendung der optimalen Probenanzahl für das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit beträgt drei Läufe mit jeweils acht Proben pro Lauf.

Hinweis: Der Master-Mix enthält mit Ausnahme der Probe und der Kontrollen alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

4. Stellen Sie die IDH1-Reaktionsgemische und die Taq unmittelbar nach der Herstellung der Master-Mixe wieder in den Gefrierschrank (–30 °C bis –15 °C).

Tabelle 2. Anzahl der Reaktionen für das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät mit 72-Well-Rotor

Proben	Reaktion
Mit dem IDH1-Master-Mix 1	
24 gDNA-Proben	24 Reaktionen
Positivkontrolle (PC)	1 Reaktion
Kontrolle ohne Template (NTC)	1 Reaktion
Mit dem IDH1-Master-Mix 2	
24 gDNA-Proben	24 Reaktionen
Positivkontrolle (PC)	1 Reaktion
Kontrolle ohne Template (NTC)	1 Reaktion

Tabelle 3. Vorbereitung von IDH1-Master-Mix 1 (MM1)*

Komponente	Volumen
IDH1-Reaktionsgemisch 1	$19,6 \mu\text{l} \times (n + 2)^*$
Taq-DNA-Polymerase (Taq)	$0,4 \mu\text{l} \times (n + 2)^*$
Gesamtvolumen	20,0 μl/Reaktion

* n = Anzahl der Reaktionen (Proben plus Kontrollen). Planen Sie beim Ansetzen des Master-Mix zwei zusätzliche Proben ($n + 2$) ein, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material vorhanden ist.

Tabelle 4. Herstellung von IDH1-Master-Mix 2 (MM2)*

Komponente	Volumen
IDH1-Reaktionsgemisch 2	$19,6 \mu\text{l} \times (n + 2)^*$
Taq-DNA-Polymerase (Taq)	$0,4 \mu\text{l} \times (n + 2)^*$
Gesamtvolumen	20,0 μl/Reaktion

* n = Anzahl der Reaktionen (Proben plus Kontrollen). Planen Sie beim Ansetzen des Master-Mix zwei zusätzliche Proben ($n + 2$) ein, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material vorhanden ist.

- Den Master-Mix durch 5–12 Sekunden langes Vortexen gründlich mischen, dann kurz zentrifugieren, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens absetzt.
- Setzen Sie die benötigte Anzahl von 0,1-ml-PCR-Röhrchenstreifen gemäß der in Tabelle 5 dargestellten Anordnung in den Ladeblock ein.

Hinweis: Lassen Sie die PCR-Röhrchenstreifen im Ladeblock, bis die Einrichtung der PCR-Reaktion abgeschlossen ist. Dadurch wird die Fehlerwahrscheinlichkeit bei der Einrichtung der PCR verringert.

- Geben Sie sofort 20 μl Master-Mix in jeden 0,1-ml-PCR-Röhrchenstreifen (nicht im Lieferumfang enthalten).

Hinweis: Geben Sie MM1 und MM2 jeweils abwechselnd in die Reihen.

Hinweis: Verschließen Sie die Röhrchen nicht. Die Deckel verbleiben im Kunststoffbehälter, bis sie benötigt werden.

- Geben Sie sofort 5 μl Wasser für die Kontrolle ohne Template (NTC) in die „Kontrolle ohne Template“-Röhrchen (PCR-Röhrchen Nr. 3 und 4).

Hinweis: Stellen Sie sicher, dass das Röhrchen „Wasser für die Kontrolle ohne Template“ für die NTC verwendet wird. Das Röhrchen „Wasser zur Probenverdünnung“ darf nicht als NTC verwendet werden.

- Verschließen Sie das Röhrchen mit der NTC (PCR-Röhrchen Nr. 3 und 4).

Tabelle 5. Anordnung der Proben im Beladungsblock (die Zahlen bezeichnen die Positionen im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an)

Gemisch

PC MM1 (1)	Probe 3 MM1 (9)	Probe 7 MM1 (17)	Probe 11 MM1 (25)	Probe 15 MM1 (33)	Probe 19 MM1 (41)	Probe 23 MM1 (49)	–	–
PC MM2 (2)	Probe 3 MM2 (10)	Probe 7 MM2 (18)	Probe 11 MM2 (26)	Probe 15 MM2 (34)	Probe 19 MM2 (42)	Probe 23 MM2 (50)	–	–
NTC MM1 (3)	Probe 4 MM1 (11)	Probe 8 MM1 (19)	Probe 12 MM1 (27)	Probe 16 MM1 (35)	Probe 20 MM1 (43)	Probe 24 MM1 (51)	–	–
NTC MM2 (4)	Probe 4 MM2 (12)	Probe 8 MM2 (20)	Probe 12 MM2 (28)	Probe 16 MM2 (36)	Probe 20 MM2 (44)	Probe 24 MM2 (52)	–	–
Probe 1 MM1 (5)	Probe 5 MM1 (13)	Probe 9 MM1 (21)	Probe 13 MM1 (29)	Probe 17 MM1 (37)	Probe 21 MM1 (45)	–	–	–
Probe 1 MM2 (6)	Probe 5 MM2 (14)	Probe 9 MM2 (22)	Probe 13 MM2 (30)	Probe 17 MM2 (38)	Probe 21 MM2 (46)	–	–	–
Probe 2 MM1 (7)	Probe 6 MM1 (15)	Probe 10 MM1 (23)	Probe 14 MM1 (31)	Probe 18 MM1 (39)	Probe 22 MM1 (47)	–	–	–
Probe 2 MM2 (8)	Probe 6 MM2 (16)	Probe 10 MM2 (24)	Probe 14 MM2 (32)	Probe 18 MM2 (40)	Probe 22 MM2 (48)	–	–	–

10. Geben Sie 5 µl jeder Probe in die Probenröhrchen (z. B. PCR-Röhrchen Nr. 5–52).
11. Verschließen Sie die Röhrchen mit den Proben.
12. Geben Sie 5 µl IDH1-Positivkontrolle (PC) in die Positivkontrollröhrchen (PCR-Röhrchen Nr. 1 und 2).
13. Verschließen Sie die Röhrchen mit der PC.
14. Markieren Sie die Deckel der Röhrchen mit einem Permanentmarker, um die Richtung anzugeben, in der die Röhrchen in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät geladen

werden sollen.

15. Führen Sie nach dem Verschließen aller PCR-Röhrchen eine Sichtkontrolle der Füllstände in den Probenröhrchen durch, um sicherzustellen, dass alle Röhrchen Probe enthalten.
16. Setzen Sie die PCR-Röhrchenstreifen in die entsprechenden Positionen des 72-Well-Rotors ein (Tabelle 5). Wenn der Rotor nicht vollständig belegt ist, müssen alle unbesetzten Positionen im Rotor mit jeweils einem verschlossenen, leeren Röhrchen bestückt werden.
17. Setzen Sie den 72-Well-Rotor sofort in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (Zubehör des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräts) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhrchen während des Laufs zu sichern.

Durchführung eines IDH1-Mutationsanalyselaufs

1. Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit muss auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät durchgeführt werden. Die Rotor-Gene AssayManager-Software v2.1 und das Gamma Plug-in müssen vor der Verwendung installiert werden.
2. Für die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core-Software und das Gamma Plug-in gibt es jeweils ein separates Benutzerhandbuch. Installationsanweisungen finden Sie in den Abschnitten „Installing Rotor-Gene AssayManager v2.1“ (Installieren des Rotor-Gene AssayManager v2.1) und „Installing plug-ins“ (Installieren von Plug-ins) im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application User Manual*.
3. Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile muss vor der Verwendung in den Rotor-Gene AssayManager importiert werden. Anweisungen dazu finden Sie im Abschnitt „Installieren des Gamma Plug-ins und Importieren des Assay-Profiles“ auf Seite 30. Das Assay-Profil enthält alle notwendigen Parameter zur Durchführung eines PCR-Laufs sowie zur automatischen Analyse und Interpretation der Ergebnisse.

4. Zur Anzeige der vom Rotor-Gene AssayManager erstellten Laufberichte muss ein PDF-Viewer installiert sein.

Die folgenden Anweisungen beschreiben die Einrichtung eines Laufs zur IDH1-Mutationsanalyse mit der Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software. Detaillierte Anweisungen finden Sie im entsprechenden Benutzerhandbuch.

5. Öffnen Sie die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software durch Doppelklicken auf das Desktop-Symbol (Abbildung 6).



Abbildung 6. Desktop-Symbol der Rotor-Gene AssayManager Software.

6. Geben Sie im Anmeldebildschirm der Rotor-Gene AssayManager Software (Abbildung 7) die Benutzer-ID und das Passwort ein, wählen Sie den Modus **Closed** und klicken Sie auf **OK**. Daraufhin öffnet sich das Hauptfenster des Rotor-Gene AssayManager Software.

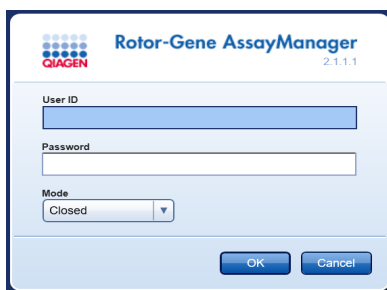


Abbildung 7. Anmeldebildschirm der Rotor-Gene AssayManager Software

7. Wählen Sie im Hauptfenster **New manual work list** (Neue manuelle Arbeitsliste), um eine neue Arbeitsliste zu erstellen (Abbildung 8, gekennzeichnet durch Kasten 1).

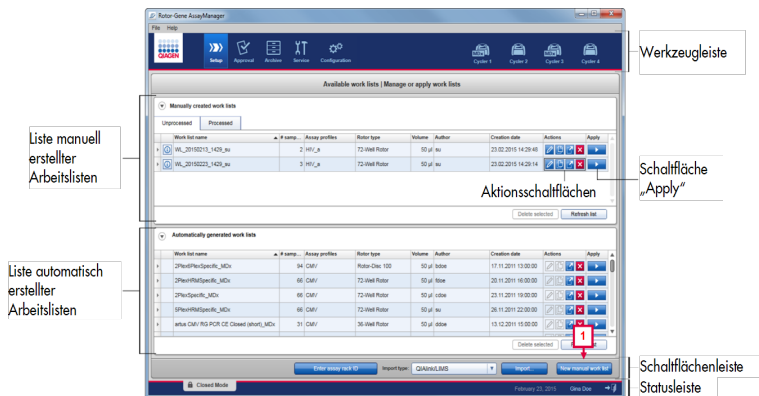


Abbildung 8. Hauptfenster der Rotor-Gene AssayManager Software. Kasten 1 kennzeichnet die Schaltfläche **New manual work list**.

8. Stellen Sie zur Durchführung eines IDH1-Laufs sicher, dass die Registerkarte **Assays** (Assays) ausgewählt ist. Klicken Sie im Fenster „Available assay profiles“ (Verfügbare Assay-Profile) (Abbildung 9, gekennzeichnet durch Kasten 1) auf das Assay-Profil **ipsogen_IDH1_Blood_BMA** und klicken Sie dann auf den **blauen Pfeil**, um das Assay-Profil auszuwählen (Abbildung 9, gekennzeichnet durch Kasten 2). Bewegen Sie den Mauszeiger über das Assay-Profil, um bei Bedarf den vollständigen Namen anzuzeigen. Das Assay-Profil sollte nun im Fenster „Selected assay profiles“ (Ausgewählte Assay-Profile) (Abbildung 9) angezeigt werden.

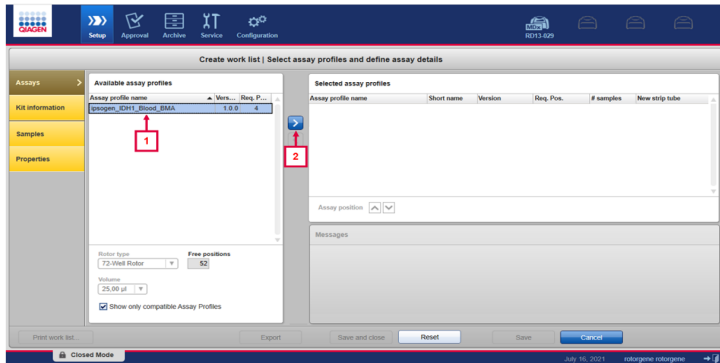


Abbildung 9. Fenster „Create work list“ (Arbeitsliste erstellen). Kasten 1 kennzeichnet das auszuwählende Assay-Profil. **Kasten 2** zeigt an, wie das gewünschte Assay-Profil ausgewählt wird.

9. Geben Sie im Fenster „Selected assay profiles“ (Abbildung 10, gekennzeichnet durch Kasten 1) die Anzahl der zu testenden Proben (ohne Kontrollen) ein. Klicken Sie anschließend auf die Registerkarte **Samples** (Proben), um Probeninformationen einzugeben (Abbildung 10, gekennzeichnet durch Kasten 2).

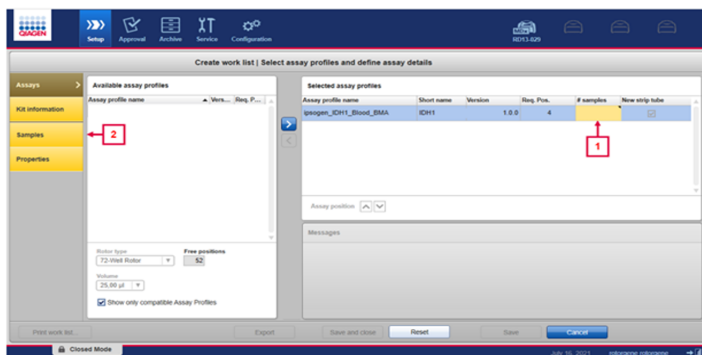


Abbildung 10. Fenster „Create work list“ auf der Registerkarte „Assays“. Kasten 1 zeigt an, wo die Probenanzahl einzugeben ist. **Kasten 2** kennzeichnet die Registerkarte „Samples“.

10. Geben Sie die Probenamen in die Spalte „Sample ID“ (Proben-ID) ein (Abbildung 11, gekennzeichnet durch Kasten 1). Geben Sie etwaige Kommentare in die Spalte „Comments“ (Kommentare) ein. Klicken Sie anschließend auf die Registerkarte **Properties** (Eigenschaften) (Abbildung 11, gekennzeichnet durch Kasten 2).

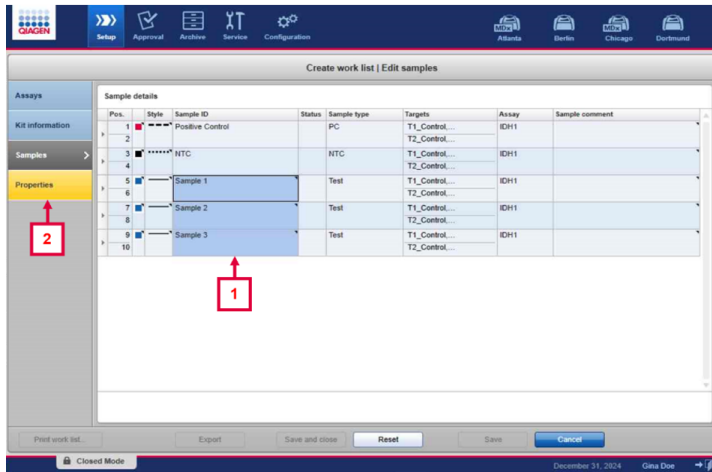


Abbildung 11. Fenster „Create work list“ auf der Registerkarte „Samples“. Kasten 1 kennzeichnet die Spalte „Samples ID“. Kasten 2 kennzeichnet die Registerkarte „Properties“.

11. Geben Sie in das Textfeld „Work list name“ (Name der Arbeitsliste) einen Namen für die Arbeitsliste ein und markieren Sie das Kontrollkästchen „work list is complete“ (can be applied) (Arbeitsliste ist vollständig [kann angewendet werden]) (Abbildung 12, gekennzeichnet durch die Kästen 1 und 2). Klicken Sie auf **Apply** (Anwenden), um die Arbeitsliste anzuwenden (Abbildung 12, gekennzeichnet durch Kasten 3).

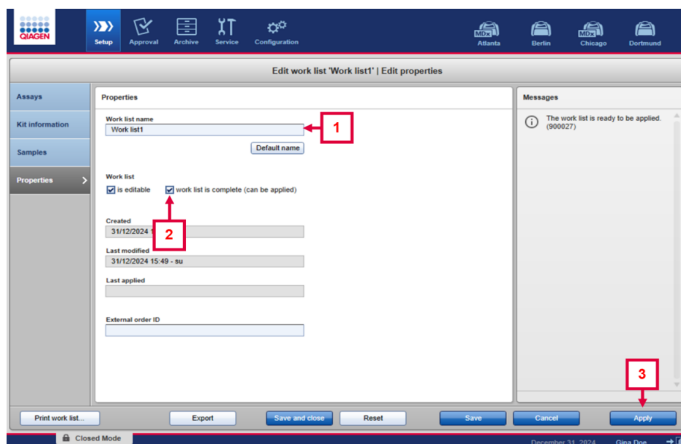


Abbildung 12. Fenster „Create work list“ auf der Registerkarte „Properties“. **Kasten 1** zeigt an, wo der Name der Arbeitsliste eingegeben werden soll. **Kasten 2** kennzeichnet das Kontrollkästchen „work list is complete“. **Kasten 3** kennzeichnet die Schaltfläche **Apply**.

12. Geben Sie in das Textfeld „Experiment name“ (Experimentname) einen Namen für das Experiment ein (Abbildung 13, gekennzeichnet durch Kasten 1). Stellen Sie sicher, dass der richtige Thermocycler ausgewählt wurde und das Kontrollkästchen „Ring attached“ (Ring angebracht) aktiviert ist (Abbildung 13, gekennzeichnet durch die Kästen 2 und 3). Klicken Sie auf **Start run** (Lauf starten), um fortzufahren (Abbildung 13, gekennzeichnet durch Kasten 4).

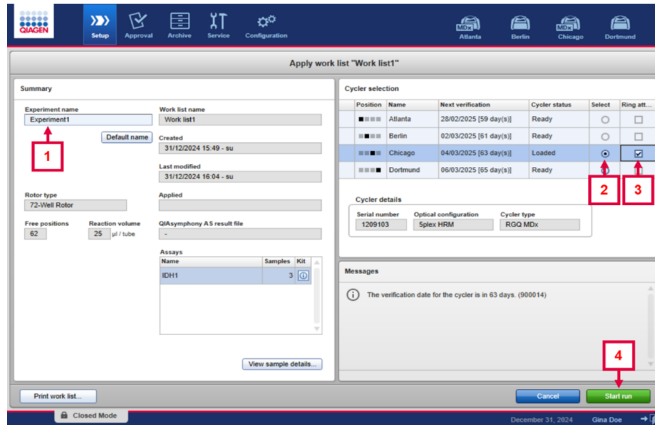


Abbildung 13. Fenster „Apply work list“ (Arbeitsliste anwenden). Kasten 1 zeigt an, wo der Name des Experiments eingegeben werden soll. Die Kästen 2 und 3 zeigen an, wo der richtige Thermocycler auszuwählen ist und wo bestätigt werden kann, dass der Ring angebracht wurde. Kasten 4 kennzeichnet die Schaltfläche **Start run**.

13. Klicken Sie nach Abschluss auf **Finish run** (Lauf beenden), um den Lauf freizugeben und zu genehmigen (Abbildung 14, gekennzeichnet durch Kasten 1).

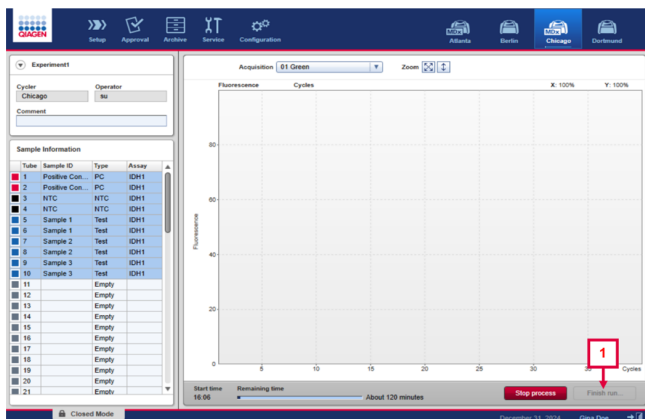


Abbildung 14. Beispiel für das Fenster „Cycler Environment“ (Umgebung „Thermocycler“). Kasten 1 kennzeichnet die Schaltfläche **Finish run**.

14. Um die Laufdaten und die Ergebnisse des IDH1-Assays anzuzeigen, klicken Sie auf **Release and go to approval** (Freigeben und mit Genehmigung fortfahren) (Abbildung 15). Dadurch wird auch das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät für den nächsten Lauf freigegeben.

The 'Finish run' dialog box contains the following fields and buttons:

- Position:** A dropdown menu showing 'Chicago'.
- Name:** A text field containing 'Chicago'.
- Run status:** A dropdown menu showing 'Run Successful'.
- Experiment name:** A text field containing 'Experiment1'.
- Errors during run:** A text area with a scroll bar.
- Comment:** A text area.
- Password:** A text field.
- Buttons:** 'Release', 'Release and go to approval', and 'Cancel'.

Abbildung 15. Dialogfeld „Finish Run“.

15. Das ipsogen_IDH1_Blood_BMA-Assay-Profil enthält alle Regeln für die automatische Assay- und Probenanalyse sowie die Interpretation der Ergebnisse. Aus diesem Grund bewertet

Hinweis: Weitere Informationen zur Interpretation der Assay-Ergebnisse finden Sie im Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“.

- Home
 Setup
 Approval
 Archive
 Service
 Configuration
 Alerts
 Barcodes
 Checkups
 Download

Experiment1
Sample_10H1_Blood_BMA

Plots and information

Processed data Experiment Work list Assay Audit trail

Experiment name
Experiment1

Reaction volume
25 µl

Rotor type
T2-Vial Rotor

Run start
31/12/2024 16:06

End of run
31/12/2024 16:09

Run on SW version
2.11.1

Cycler serial no.
I269103

Run operator
Gina Doe (su)

Run released by
System (automatically)

Run comment

Messages

Results

Results - test samples

Plex.	☒	Style	Sampl...	Type	Sample	Overall s...	Output	FL	CL	Value	Comp.	Individual targ...	Flags
1	☒	---	Posib...	PC		Valid	T1_Control	0.50	30.59	-	-	Valid	-
2	☒	---	Posib...	PC		Valid	T1_R112M	0.65	26.52	-	-	Valid	-
							T1_R132C	0.27	31.27	-	-	Valid	-
							T1_R132S	0.30	30.79	-	-	Valid	-
							T2_Control	0.57	30.86	-	-	Valid	-
							T2_R132D	0.30	30.15	-	-	Valid	-
							T2_R132L	0.29	30.81	-	-	Valid	-

Comp. unit: --- ☐ Show IC Assay comment:

Create support package... Save and close Reset Save Close Release / report data...

Abbildung 16. Fenster „Assay Results“ mit Ergebnis „Valid“.

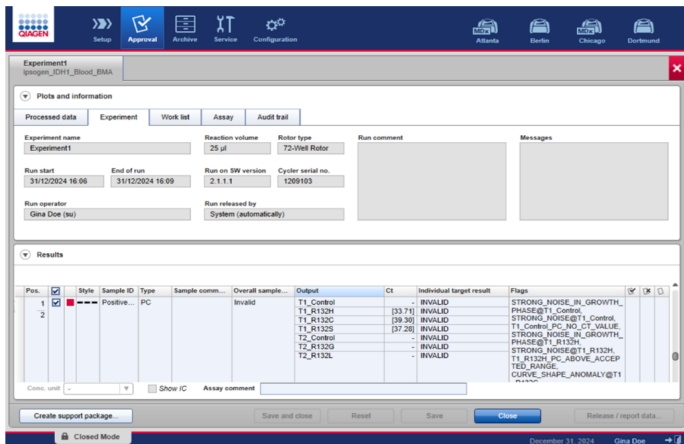


Abbildung 17. Fenster „Assay Results“ mit Ergebnis „Invalid“.

- Wenn die Ergebnisse der Probenkontrolle im zulässigen Bereich liegen, wird in der Spalte „Overall sample result“ entweder „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) oder „IDH1 Mutation Detected“ (IDH1-Mutation nachgewiesen) angezeigt (Abbildung 18). Dies verweist darauf, dass die DNA-Konzentration in der Probe für die Mutationsanalyse geeignet ist.

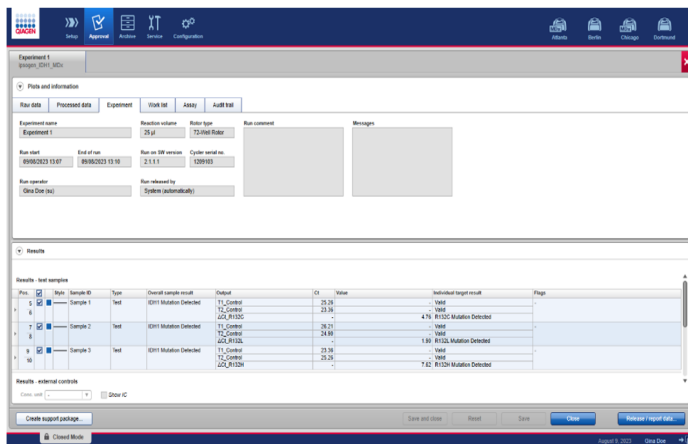


Abbildung 18. Fenster „Sample results“ (Probenergebnisse).

18. Klicken Sie auf **OK**, um das Experiment im Archiv zu speichern und eine LIMS-Ausgabe sowie einen Laufbericht zu erstellen (Abbildung 19). Laufberichte und LIMS-Exporte werden im Standardverzeichnis für Berichte gespeichert. Das Standardverzeichnis befindet sich in den Datenexportverzeichnissen auf der Registerkarte „Configuration“.

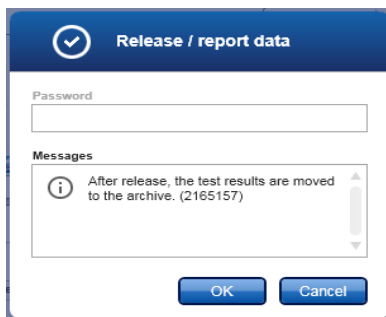


Abbildung 19. Dialogfeld „Release / report data“ (Daten freigeben/berichten).

19. Das Dialogfeld „Status of release“ (Freigabestatus) wird angezeigt. Klicken Sie zum Akzeptieren auf **OK** (Abbildung 20).

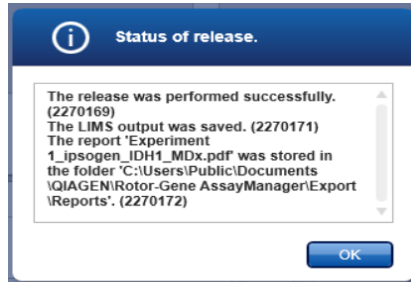


Abbildung 20. Dialogfeld „Status of release“.

20. Freigegebene Experimente können nun in der Umgebung „Archive“ (Archiv) abgerufen werden. Um ein Experiment zu finden, klicken Sie auf die Registerkarte **Archive** und geben Sie die erforderlichen Suchkriterien ein.

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Analyse und die Mutationsbestimmungen werden nach Abschluss eines Laufs automatisch durch die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software unter Verwendung des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile durchgeführt und erfordern keine manuelle Interpretation.

Im Folgenden wird erläutert, wie die Analyse und die Mutationsbestimmungen durchgeführt werden.

Analyse und Mutationsbestimmungen

Der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einer bestimmten Reaktion den durch das *ipsogen_IDH1_Blood_BMA*-Assay-Profil vorgegebenen Schwellenwert überschreitet, wird als Ct-Wert definiert. Ct-Werte geben die Menge der spezifischen Ausgangs-DNA an. Niedrige Ct-Werte weisen auf eine höhere DNA-Ausgangsmenge hin, während hohe Ct-Werte eine geringere DNA-Ausgangsmenge anzeigen. Für jeden IDH1-Mutationsassay wird eine Berechnung durchgeführt, um den Δ Ct-Wert anhand der folgenden Gleichung zu bestimmen:

$$\Delta Ct = [\text{mutation assay Ct value}] - [\text{control assay Ct value}]$$

Auf der Grundlage vorgegebener analytischer Ct- und Δ Ct-Werte bestimmt das *ipsogen_IDH1_Blood_BMA*-Assay-Profil qualitativ den Mutationsstatus der DNA-Proben und gibt an, ob eine Probe eine oder mehrere der spezifizierten IDH1-Mutationen enthält.

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

Wenn die Ct-Werte außerhalb des zulässigen Bereichs liegen, wird das Ergebnis „INVALID“ ausgegeben und ein oder mehrere Kennzeichnungen werden gemeldet. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „*ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile-Kennzeichnungen“ auf der nächsten Seite. Wenn beispielsweise der Ct-Wert der

Probenkontrolle unterhalb des zulässigen Bereichs liegt, bedeutet dies, dass zu viel DNA aufgegeben wurde und die Probe verdünnt werden muss.

Hinweis: Der IDH1-Mutationsstatus wird im Falle einer ungültigen Probe oder eines ungültigen Laufs nicht angegeben.

Die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software bestimmt das Ergebnis für jedes Biomarkerziel durch Kombination aller relevanten Analyseergebnisse gemäß den Kernanalysealgorithmen wie Normalisierung sowie Proben- und Assay-Regeln, die im entsprechenden Assay-Profil definiert sind.

Einer einzelnen Probe können folgende Ergebnisse zugewiesen werden:

- IDH1 Mutation Detected
- No Mutation Detected
- INVALID: Wenn der Probe während der Analyse durch die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software ein oder mehrere Kennzeichnungen zugewiesen werden, die so definiert sind, dass das Zielergebnis auf „INVALID“ gesetzt wird.

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

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile-Kennzeichnungen

Die dem Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in entsprechenden und nicht ausschließlich für dieses *ipsogen*_IDH1_Blood_BMA -Assay-Profil spezifischen Kennzeichnungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6. Kennzeichnungen im Zusammenhang mit dem Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in

Kennzeichnung	Beschreibung	Maßnahme
ANALYSIS_FAILED (ANALYSE_ FEHLGESCHLAGEN)	Der Assay ist als ungültig eingestuft, da die Analyse fehlgeschlagen ist.	Technischen Support von QIAGEN kontaktieren.
ASSAY_INVALID (ANALYSE_ UNGÜLTIG)	Probe ist ungültig, weil mindestens eine externe Kontrolle ungültig ist.	Lauf wiederholen. Siehe Tabelle 7.
CONSECUTIVE_FAULT (FOLGEFEHLER)	Ein Ziel, das zur Berechnung dieses Ziels verwendet wurde, ist ungültig.	Keine zusätzlichen Maßnahmen erforderlich
CURVE_SHAPE_ANOMALY (ANOMALE_KURVENFORM)	Die Rohdaten-Amplifikationskurve weist eine Form auf, die vom bekannten Verhalten für diesen Assay abweicht. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit für falsche Ergebnisse oder eine Fehlinterpretation der Ergebnisse.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.
FLAT_BUMP (FLACHER_HÜGEL)	Die Amplifikationskurve hat die Form eines flachen Hügels, die vom festgelegten Verhalten dieses Assays abweicht. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit für falsche Ergebnisse oder eine Fehlinterpretation der Ergebnisse (z. B. fehlerhafte Bestimmung des Ct-Werts).	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (MEHRFACHE_KREUZUNG_ SCHWELLENWERT)	Die Amplifikationskurve kreuzt den Schwellenwert mehr als einmal. Ein eindeutiger Ct-Wert kann nicht bestimmt werden.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.
NO_BASELINE (KEINE_BASISLINIE)	Es wurde keine Anfangsbasislinie erkannt. Die anschließende Analyse kann nicht durchgeführt werden.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.

Kennzeichnung	Beschreibung	Maßnahme
OTHER_TARGET_INVALID (ANDERES_ZIEL_UNGÜLTIG)	Ein anderes Ziel für die gleiche Probe ist ungültig.	Keine zusätzlichen Maßnahmen erforderlich
RUN_FAILED (LAUF_FEHLGESCHLAGEN)	Ungültiger Assay wird aufgrund eines Problems mit dem Thermocycler oder der Verbindung mit dem Thermocycler als ungültig eingestuft.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.
RUN_STOPPED (LAUF_ANGEHALTEN)	Ungültiger Assay wird als ungültig eingestuft, da der Lauf manuell angehalten wurde.	Lauf wiederholen.
SATURATION (SÄTTIGUNG)	Die Rohdaten-Fluoreszenz weist vor dem Wendepunkt der Amplifikationskurve eine deutliche Sättigung auf.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.
SPIKE (SPITZE)	In der Amplifikationskurve wurde ein Spike in den Fluoreszenz-Rohdaten erkannt, der jedoch außerhalb der Region liegt, in welcher der Ct-Wert bestimmt wird.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (SPITZE_NAHE_CT)	In der Amplifikationskurve wurde ein Spike nahe dem Ct-Wert erkannt.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.
STEEP_BASELINE (STEILE_BASISLINIE)	In der Amplifikationskurve wurde eine steil ansteigende Basislinie für die Rohdaten-Fluoreszenz erkannt.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.

Kennzeichnung	Beschreibung	Maßnahme
STRONG_BASELINE_DIP (STARKER_ABFALL_BASISLINIE)	Die Amplifikationskurve weist einen deutlichen Abfall der Basislinie für die Rohdaten-Fluoreszenz auf.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.
STRONG_NOISE (STARKES_RAUSCHEN)	Außerhalb der Wachstumsphase der Amplifikationskurve wurde starkes Rauschen erkannt.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (STARKES_RAUSCHEN_IN_WACHSTUMSPHASE)	In der (exponentiellen) Wachstumsphase der Amplifikationskurve wurde starkes Rauschen erkannt.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (WELLENFÖRMIGE_FLUORESCENZ_BASISLINIE)	Die Amplifikationskurve weist eine wellenförmige Basislinie für die Rohdaten-Fluoreszenz auf.	Test wiederholen. Technischen Support von QIAGEN kontaktieren, wenn diese Kennzeichnung während der Testwiederholung auftritt.

Die möglichen Kennzeichnungen, die durch das ipsogen_IDH1_Blood_BMA- Assay- Profil generiert werden können, ihre Bedeutung und die zu ergreifenden Maßnahmen sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt.

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

Zum Beispiel:

T1_Control_PC_NO_CT_VALUE = die Positivkontrolle (PC), Kontrollassay für Röhrchen 1 hat keinen Ct-Wert

Siehe auch Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“.

Tabelle 7. Vom *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile für PC und NTC verwendete Software-Kennzeichnungen

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
T1_<target>_PC_NO_CT_VALUE (T1_<Ziel>_PC_KEIN_CT-WERT) oder T2_<target>_PC_NO_CT_VALUE (T2_<Ziel>_PC_KEIN_CT-WERT)	Ungültiger Lauf. Kein Ct-Wert für PC.	Lauf wiederholen.
T1_<target>_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE (T1_<Ziel>_PC_OBERHALB_ZULÄSSIGEN_BEREICHS) oder T2_<target>_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE (T2_<Ziel>_PC_OBERHALB_ZULÄSSIGEN_BEREICHS)	Ungültiger Lauf. PC oberhalb des Spezifikationsbereichs.	Lauf wiederholen.
T1_<target>_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE (T1_<Ziel>_PC_UNTERHALB_ZULÄSSIGEN_BEREICHS) oder T2_<target>_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE (T2_<Ziel>_PC_UNTERHALB_ZULÄSSIGEN_BEREICHS)	Ungültiger Lauf. PC unterhalb des Spezifikationsbereichs.	Lauf wiederholen.
T1_<target>_ NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE (T1_<Ziel>_ NTC_UNERWARTETER_CT-WERT) oder T2_<target>_NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE (T2_<Ziel>_ NTC_UNERWARTETER_CT-WERT)	Ungültiger Lauf. Ct-Wert wurde in NTC detektiert.	Lauf wiederholen.

Tabelle 8. Vom *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile für Proben verwendete Software-Kennzeichnungen

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
T1_Control_DNA_ INPUT_TOO_ HIGH (T1_Kontrolle_ZU_ VIEL_AUSGANGS-DNA) oder T2_Control_DNA_INPUT_TOO_ HIGH (T2_Kontrolle_ZU_ VIEL_AUSGANGS-DNA)	Ungültige Probe. Ct-Wert der Probenkontrolle unterhalb des Arbeitsbereichs der Kontrolle.	DNA-Quantifizierung und -Normalisierung wiederholen. Wenn der Ct-Wert der Kontrolle nach der Testwiederholung weiterhin ungültig ist, Probe erneut extrahieren. Falls der Ct-Wert der Kontrolle nach erneuter Extraktion und zwei weiteren Testläufen ungültig ist, sollte „unbestimmter Mutationsstatus“ als Ergebnis der Probe angegeben werden.
T1_Control_ABOVE_ACCEPTED_ RANGE (T1_Kontrolle_ OBERHALB_ZULÄSSIGEN_ BEREICHS) oder T2_Control_ABOVE_ACCEPTED_ RANGE (T2_Kontrolle_ OBERHALB_ZULÄSSIGEN_ BEREICHS)	Ungültige Probe. Ct-Wert der Probenkontrolle oberhalb des Arbeitsbereichs der Kontrolle.	DNA-Quantifizierung und -Normalisierung wiederholen. Wenn der Ct-Wert der Kontrolle nach der Testwiederholung weiterhin ungültig ist, Probe erneut extrahieren. Falls der Ct-Wert der Kontrolle nach erneuter Extraktion und zwei weiteren Testläufen ungültig ist, sollte „unbestimmter Mutationsstatus“ als Ergebnis der Probe angegeben werden.
T1_Control_NO_CT_VALUE (T1_Kontrolle_KEIN_CT_WERT) oder T2_Control_NO_CT_VALUE (T2_Kontrolle_KEIN_CT_WERT)	Ungültige Probe. Kein Ct-Wert in der Probe.	DNA-Quantifizierung und -Normalisierung wiederholen. Wenn der Ct-Wert der Kontrolle nach der Testwiederholung weiterhin ungültig ist, Probe erneut extrahieren. Falls der Ct-Wert der Kontrolle nach erneuter Extraktion und zwei weiteren Testläufen ungültig ist, sollte „unbestimmter Mutationsstatus“ als Ergebnis der Probe angegeben werden.

Hinweis: Wenn eine erneut getestete Probe nach der Wiederholung aus einem anderen Grund ungültig ist, ist dieser Lauf trotzdem als zweiter Versuch anzusehen und eine erneute Extraktion der Probe ist durchzuführen. Siehe Abbildung 21 für Verfahren zur Testwiederholung und erneuten Extraktion.

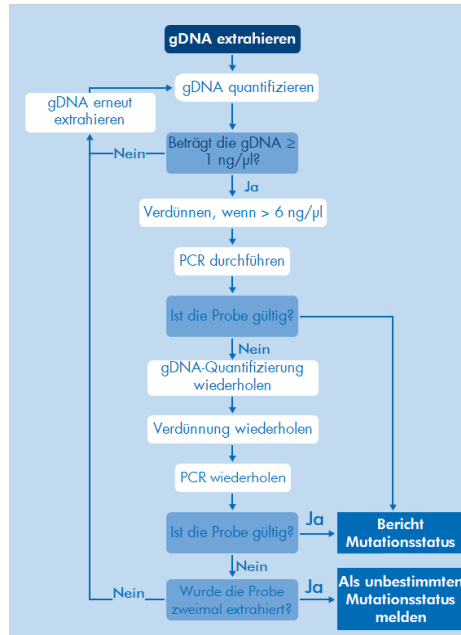


Abbildung 21. Flussdiagramm für das Verfahren zum erneuten Testen von Proben.

12. Anwendungseinschränkungen

Der Test ist nicht zur Verwendung als Begleitdiagnostikum vorgesehen, um Kliniker bei der Identifizierung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Cholangiokarzinom zu unterstützen, die basierend auf dem Nachweis einer IDH1-Mutation für eine Behandlung mit TIBSOVO infrage kommen könnten.

Ob Mutationen nachgewiesen werden, hängt von der Qualität der Proben und der Menge an amplifizierbarer DNA in der Probe ab.

Der Test ist für den Nachweis von fünf Mutationen im Codon 132 des IDH1-Gens bestimmt. Proben, für die das Ergebnis „No Mutation Detected“ angegeben wird, können IDH1-Mutationen enthalten, die vom Assay nicht erkannt werden.

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit nutzt auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierendes Verfahren. Wie bei allen PCR-Verfahren können Proben durch externe DNA-Quellen in der Testumgebung und DNA aus der Positivkontrolle kontaminiert werden. Beachten Sie daher bei der Arbeit alle Vorsichtsmaßnahmen, um eine Kontamination der Proben und Reaktionsgemisch-Reagenzien zu vermeiden.

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist nur zur Verwendung mit Vollblut- und Knochenmarkaspiratproben bestimmt, die in K2-EDTA-Röhrchen entnommen wurden.

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist nur zur Verwendung mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit bestimmt.

Zur Gewährleistung optimaler Ergebnisse müssen die Anweisungen im Handbuch zum *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit *ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit Handbook* genau befolgt werden. Eine Verdünnung der Reagenzien, die von den in diesem Handbuch beschriebenen Anweisungen abweicht, ist nicht empfehlenswert und führt zu einer Leistungsbeeinträchtigung.

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit darf nur verwendet werden, wenn alle Reaktionskomponenten aus derselben Kit-Charge zusammen verwendet werden.

Das Produkt ist ausschließlich zur Verwendung mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät bestimmt.

Der *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist ein qualitativer Test. Der Test dient nicht zur quantitativen Messung des prozentualen Mutationsanteils.

Die Leistung des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit bei Einschleppen einer mikrobiellen Kontamination während des Assayverfahrens ist nicht bekannt.

Die Leistung des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit könnte durch das Vorhandensein von Cytarabin, Decitabin, Triglyceriden, Etoposid, Idarubicinhydrochlorid, Daunorubicinhydrochlorid oder Azacitidin in den Testproben beeinträchtigt werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Analytische Leistung

13.1.1. Leerwertgrenze

Die Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB) ist in der CLSI-Richtlinie EP17-A2 definiert als „das höchste Messergebnis, von dem anzunehmen ist, dass es in Leerproben (mit einer angegebenen Wahrscheinlichkeit) beobachtet werden kann“. Für das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist dies der Datenpunkt, der dem oberen 95. Perzentil in den Leerproben (Wildtyp, d. h. R132-mutationsnegativ) entspricht.

Die LoB wurde durch Messung des Breakthrough-Niveaus für jeden der fünf IDH1-Mutationsassays des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit bestimmt. Dabei ist Breakthrough definiert als die unspezifische, in geringfügigem Ausmaß erfolgende Amplifikation eines DNA-Templates. Für das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit bezieht sich dies auf die unspezifische Bindung einer Mutantensonde an die Wildtyp-DNA.

Tabelle 9. Zusammenfassung der LoB-Ergebnisse

IDH1-Assay	LoB (Ct-Wert)
R132H	Keine Amplifikation
R132C	Keine Amplifikation
R132S	Keine Amplifikation
R132G	Keine Amplifikation
R132L	Keine Amplifikation

Auf Grundlage dieser Analyse wurde die LoB für den Assay als das Fehlen eines Ct-Werts bestimmt.

13.1.2. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) ist definiert als die niedrigste Allelfrequenz der IDH1-R132-Mutation (in einem Hintergrund aus Wildtyp-DNA), die in 95 % der Fälle nachgewiesen werden kann. Genomische DNA wurde aus Vollblut- (WB-) und BMA-Proben extrahiert, die mit DNA der Mutantenzelllinie R132 versetzt worden waren, und in normalisierte DNA verdünnt, die aus klinischen WB- und BMA-Wildtyp-Proben extrahiert worden war. Die genomische DNA wurde für jeden Assay seriell auf %-MAF-Konzentrationen oberhalb, bei und unterhalb der geschätzten LoD verdünnt.

Mindestens 60 Replikate jeder Verdünnung der prozentualen Mutanten-Allelfrequenz (MAF) in der Serie bei niedriger DNA-Ausgangsmenge wurden unter Verwendung von drei *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Chargen getestet. Die LoD für jeden Assay wurde mithilfe eines Probit-Modells (Tabelle 10) bestimmt.

Tabelle 10. Zusammenfassung der LoD-Ergebnisse

IDH1-Assay	LoD (% MAF)
R132H	1,25
R132C	2,70
R132S	4,70
R132G	3,20
R132L	2,90

Die LoD wurde über den gesamten Gültigkeitsbereich der *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Chargen verifiziert.

13.1.3. Assay-Cutoff

Der Assay-Cutoff ist ein spezifischer ΔC_t -Wert zur Bestimmung, ob eine Probe als positiv oder negativ für eine IDH1-R132-Mutation eingestuft wird. Proben, deren ΔC_t -Werte bei oder

unterhalb des Cutoffs liegen, werden als R132-mutationspositiv eingestuft (d. h. R132-Mutation nachgewiesen), und Proben, deren ΔC_t -Werte oberhalb des Cutoffs liegen, werden als R132-mutationsnegativ (d. h. keine Mutation nachgewiesen) eingestuft. Die Falsch-Negativ- und Falsch-Positiv-Raten für jeden IDH1-mutationsspezifischen Assay wurden verwendet, um einen Cutoff-Wert für jeden Mutationsassay zu bestimmen, sodass ein Ergebnis gleich dem oder kleiner als der Cutoff zu einer Einstufung als „IDH1 Mutation Detected“ führt. Der Cutoff für jeden Assay im *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11. Zusammenfassung der Assay-Cutoff-Werte

IDH1-Assay	Assay-Cutoff (ΔC_t -Wert)
R132H	14,75
R132C	14,75
R132S	14,75
R132G	14,75
R132L	14,75

13.1.4. Ausgangsmengen genomischer DNA

Die DNA-Ausgangsmenge ist definiert als die Gesamtmenge amplifizierbarer DNA in einer Probe, bestimmt anhand des C_t -Werts der Kontrollreaktion. Um zu zeigen, dass die Leistung des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit über den Arbeitsbereich der Kontrollreaktion (CWR) (21,54–25,25 C_t) hinweg konsistent ist, wurde eine 7-stufige Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen DNA-Ausgangsmengen getestet (wobei die höchste und die niedrigste Menge außerhalb des CWR lagen). Dies wurde für den Wildtyp und für jede der fünf R132-Mutationen (bei 1,5× LoD) sowie für WB- und BMA-Proben durchgeführt.

Die Evaluierung wurde mit drei Chargen des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit durchgeführt, wobei sechs Replikate pro DNA-Ausgangsmenge getestet wurden (zwei Replikate pro Kit-Charge). Die Datenauswertung erfolgte mittels Regressionsanalyse zur Bestimmung des linearen

Bereichs. Damit der Assay als linear über die DNA-Ausgangsmengen bestimmt werden kann, darf sich ΔC_t für mutationspositive Proben über den Mengenbereich hinweg nicht ändern, (d. h. kein statistisch signifikanter linearer, quadratischer oder kubischer Effekt). Damit der Assay bei Wildtyp-Proben als linear über die DNA-Ausgangsmengen bestimmt werden kann, sollte beim Kontroll- C_t ein statistisch signifikanter linearer Effekt in Bezug auf die Verdünnungsstufe und kein statistisch signifikanter quadratischer oder kubischer Effekt vorliegen.

Parameterschätzungen für die getesteten Verdünnungen belegten die Linearität für alle Proben. Über den gesamten für den Assay getesteten Bereich der DNA-Ausgangsmengen wurde ein linearer ΔC_t - und Kontroll- C_t -Bereich beobachtet.

13.1.5. Messgenauigkeit

Präzision

Die Wiederholbarkeit des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit wurde durch Testen künstlich hergestellter Proben bei zwei Mutationskonzentrationen ($1\times$ LoD und $2\times$ LoD) bei der Standard-DNA-Ausgangsmenge von 5 ng/ μ l bewertet; zudem wurden Wildtyp-Proben bei Standard- (5 ng/ μ l) und niedrigen DNA-Ausgangsmengen (3,5 ng/ μ l) an einem Standort (im Vereinigten Königreich) getestet. Die Proben wurden als Dreifachbestimmung in vier Läufen pro Probe über mehrere Tage, auf verschiedenen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräten, durch verschiedene Bediener und unter Verwendung von drei Chargen des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit getestet, um insgesamt mindestens 106 Replikate pro Probe zu generieren (Tabelle 12 und Tabelle 13).

Tabelle 12. Wiederholbarkeit des Assays für Knochenmarkaspiratproben*

Mutation	Konzentration	Anteil gültiger Ergebnisse	Korrekte Bestimmungen (%)	Untergrenze zweiseitiges 95%-KI
Wildtyp	3,5 ng/µl	108/108	100,00	96,64
	5 ng/µl	106/106	100,00	96,58
R132H	1× LoD	106/108	98,15	93,47
	2× LoD	107/107	100,00	96,61
R132C	1× LoD	105/106	99,06	94,86
	2× LoD	108/108	100,00	96,64
R132S	1× LoD	99/106	93,40	86,87
	2× LoD	108/108	100,00	96,64
R132G	1× LoD	107/108	99,07	94,95
	2× LoD	108/108	100,00	96,64
R132L	1× LoD	107/108	99,07	94,95
	2× LoD	108/108	100,00	96,64

* Anzahl korrekter Bestimmungen und untere zweiseitige 95%-Konfidenzgrenzen für jede IDH1-Mutation bei 1× und 2× LoD sowie für Wildtyp-Proben, die an einem Standort getestet wurden.

Tabelle 13. Assay-Wiederholbarkeit für Vollblutproben*

Mutation	Konzentration	Anteil gültiger Ergebnisse	Korrekte Bestimmungen (%)	Untergrenze zweiseitiges 95%-KI
Wildtyp	3,5 ng/µl	107/107	100,00	96,61
	5 ng/µl	108/108	100,00	96,64
R132H	1× LoD	108/108	100,00	96,64
	2× LoD	107/107	100,00	96,61
R132C	1× LoD	107/108	99,07	94,95
	2× LoD	107/107	100,00	96,61

Mutation	Konzentration	Anteil gültiger Ergebnisse	Korrekte Bestimmungen (%)	Untergrenze zweiseitiges 95%-KI
R132S	1× LoD	97/108	89,81	82,51
	2× LoD	107/107	100,00	96,61
R132G	1× LoD	106/107	99,07	94,90
	2× LoD	108/108	100,00	96,64
R132L	1× LoD	105/106	99,06	94,86
	2× LoD	106/106	100,00	96,58

* Anzahl korrekter Bestimmungen und untere zweiseitige 95%-Konfidenzgrenzen für jede IDH1-Mutation bei 1× und 2× LoD sowie für Wildtyp-Proben, die an einem Standort getestet wurden.

13.1.6. Laborpräzision

Die Präzision des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit innerhalb eines Labors (Wiederholbarkeit) wurde bewertet. Die Präzision der ΔC_t -Werte (die Differenz der C_t -Werte zwischen einer Mutationsreaktion und der Kontrollreaktion) für positive Testproben und die Kontroll- C_t -Werte für negative Testproben sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14. Laborpräzision von ΔC_t und Kontroll- C_t *

Proben- typ	Analyse- variable	Ziel- mutation	Assay	N	MW	Labor- präzision (SD)
BMA	ΔCt	R132C	RM1	108	6,17	0,8177
		R132G	RM2	108	7,22	0,6411
		R132H	RM1	107	5,92	0,6161
		R132L	RM2	108	6,54	0,3887
		R132S	RM1	108	7,68	0,5616
	Kontroll-Ct	WT	RM1	106	23,67	0,0903
			RM2	106	23,72	0,1277
	WB	ΔCt	R132C	RM1	107	6,77
R132G			RM2	108	6,40	1,1413
R132H			RM1	107	6,15	0,8026
R132L			RM2	106	7,03	0,4312
R132S			RM1	107	7,00	0,6764
Kontroll-Ct		WT	RM1	108	23,67	0,0890
			RM2	108	23,76	0,1123

* Mittelwert und Standardabweichung (Laborpräzision) für den ΔC_t jedes Mutationsassays bei mutationspositiven Proben mit 2x LoD sowie für den Kontroll- C_t bei WT-Proben mit einer DNA-Ausgangsmenge von 5 ng/µl, einschließlich der Probenotypen BMA und WB.

13.1.7. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit wurde durch Testen künstlich hergestellter Proben bei zwei Mutationskonzentrationen (1× LoD und 2× LoD) bei der Standard-DNA-Ausgangsmenge von 5 ng/µl bewertet; zudem wurden Wildtyp-Proben bei Standard- (5 ng/µl) und niedrigen DNA-Ausgangsmengen (3,5 ng/µl) an drei Standorten (einer im Vereinigten Königreich und zwei in den USA) getestet. Die Proben wurden als Doppelbestimmung in sechs Läufen pro Probe über mehrere Tage, auf verschiedenen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräten, durch verschiedene Bediener und unter Verwendung von drei Chargen des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit getestet, um insgesamt mindestens 178 Replikate pro Probe zu generieren (Tabelle 15 und Tabelle 16).

Tabelle 15. Assay-Reproduzierbarkeit für Knochenmarkaspiratproben*

Mutation	Konzentration	Anteil gültiger Ergebnisse	Korrekte Bestimmungen (%)	Untergrenze zweiseitiges 95%-KI
Wildtyp	3,5 ng/µl	179/179	100	97,96
	5 ng/µl	178/178	100	97,95
R132H	1× LoD	178/180	98,89	96,04
	2× LoD	179/179	100	97,96
R132C	1× LoD	177/178	99,44	96,91
	2× LoD	179/180	99,44	96,94
R132S	1× LoD	167/178	93,82	89,21
	2× LoD	179/180	99,44	96,94
R132G	1× LoD	179/180	99,44	96,94
	2× LoD	180/180	100	97,97
R132L	1× LoD	179/180	99,44	96,94
	2× LoD	180/180	100	97,97

* Anzahl korrekter Bestimmungen und untere zweiseitige 95%-Konfidenzgrenzen für jede IDH1-Mutation bei 1× und 2× LoD sowie für Wildtyp-Proben, die an drei Standorten getestet wurden.

Tabelle 16. Assay-Reproduzierbarkeit für Vollblutproben*

Mutation	Konzentration	Anteil gültiger Ergebnisse	Korrekte Bestimmungen (%)	Untergrenze zweiseitiges 95%-KI
Wildtyp	3,5 ng/µl	179/179	100	97,96
	5 ng/µl	180/180	100	97,97
R132H	1× LoD	180/180	100	97,97
	2× LoD	179/179	100	97,96
R132C	1× LoD	178/180	98,89	96,04
	2× LoD	179/179	100	97,96
R132S	1× LoD	159/180	88,33	82,72
	2× LoD	179/179	100	97,96
R132G	1× LoD	178/179	99,44	96,93
	2× LoD	180/180	100	97,97
R132L	1× LoD	177/178	99,44	96,91
	2× LoD	178/178	100	97,95

* Anzahl korrekter Bestimmungen und untere zweiseitige 95%-Konfidenzgrenzen für jede IDH1-Mutation bei 1× und 2× LoD sowie für Wildtyp-Proben, die an drei Standorten getestet wurden.

13.1.8. Austauschbarkeit der Chargen

Ziel dieser Studie war es, zu zeigen, dass unabhängig von den verwendeten Chargen des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit und des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (IDH1 Kit) der Mutationsstatus für alle Proben – sowohl aus peripherem Blut (PB) als auch aus Knochenmarkaspirat (BMA) – für alle Ziele konsistent ist.

Um die Austauschbarkeit der Kit-Chargen zu bewerten, wurden in dieser Studie fünf Mutationsproben (eine für jedes vom IDH1 Kit nachgewiesene Mutationsziel) und eine WT-Probe pro Probentyp (insgesamt 12 Proben) verwendet. Für jede Probe wurden vier Extraktionsreplikate unter Verwendung von drei unabhängigen Chargen des Extraktionskits extrahiert. Die DNA-Konzentration für jedes Replikat wurde quantifiziert und anschließend auf

5 ng/µl normalisiert (sofern sie nicht bereits im Bereich von 1–6 ng/µl lag). Jedes Replikat wurde anschließend mittels PCR untersucht, wobei pro Reaktionsgemisch ein Replikat unter Verwendung von drei unabhängigen IDH1 Kit-Chargen eingesetzt wurde.

Um die Austauschbarkeit der Chargen zu verifizieren, musste über alle Kombinationen der QIAamp DSP DNA Blood Mini und *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Chargen hinweg eine Rate korrekter Bestimmungen von > 90 % für jedes Ziel in jedem Probentyp (PB und BMA) festgestellt werden.

Es wurde festgestellt, dass für alle Ziele eine Rate korrekter Bestimmungen von > 90 % erzielt wurde. Mit Ausnahme von R132H im PB-Probentyp wurde eine Rate korrekter Bestimmungen von 100 % (36/36) erzielt. Der PB-Probentyp R132H ergab eine Rate korrekter Bestimmungen von 91,67 % (33/36). Damit wurde die Anforderung an die Austauschbarkeit der Chargen des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit und *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit erfüllt.

13.1.9. Kreuzkontamination / analytische Verschleppung

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit auf Verschleppungen, wenn IDH1-mutationspositive Proben neben IDH1-mutationsnegativen (Wildtyp) Proben getestet werden. In der Studie wurde das gesamte IDH1-System von der Extraktion bis zur PCR-Amplifikation untersucht und geprüft, ob es zu Verschleppungen zwischen Proben, Extraktionen und innerhalb von bzw. zwischen Läufen kam.

Diese Studie wurde mit mutationspositiven (entweder R132C oder R132L) und Wildtyp-WB- oder BMA-Proben durchgeführt. Zwei unabhängige Probensätze wurden gemäß einer vordefinierten Extraktionsmatrix extrahiert, die darauf ausgelegt war, ein Risiko für eine Kreuzkontamination der Proben zu schaffen.

Die Kreuzkontamination bei der Extraktion wurde in sechs Extraktionsläufen getestet, und die Kreuzkontamination bei der PCR wurde in sechs PCR-Läufen gemäß einer Laufmatrix getestet, die darauf ausgelegt war, ein Risiko für eine Kreuzkontamination der Proben zu schaffen.

Extraktions- und PCR-Läufe wurden nacheinander von demselben Bediener (ein Bediener pro unabhängigem Probensatz) mit demselben Gerät eingerichtet, wobei zwischen diesen Läufen keine weiteren Läufe mit diesem Gerät eingerichtet und für jeden Probensatz separate Geräte verwendet wurden. Eine Charge des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit und eine Charge des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit wurden während der gesamten Studie verwendet.

Insgesamt wurden 144 Wildtyp-Replikate getestet, wobei bei keinem Wildtyp-Replikat eine R132C- oder R132L-Mutation als Ergebnis festgestellt wurde. Damit wurde das Fehlen einer Kreuzkontamination der Wildtyp-Proben durch mutationspositive Proben nachgewiesen, die demselben Verfahren für die DNA-Extraktion und die Testeinrichtung unterzogen wurden.

13.1.10. Handhabung der Proben

In dieser Studie wurde die Variabilität der Probenhandhabung während des DNA-Extraktionsprozesses unter Verwendung des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kits bewertet. Vollblut (WB)- und Knochenmarkaspirat (BMA)-Proben wurden in drei unabhängigen Laboren getestet. An jedem der drei Standorte wurden vier Extraktionen pro Probe durchgeführt (12 Proben – jeweils fünf IDH1-Mutationsproben und eine Wildtyp-Probe für beide Probentypen), was insgesamt 144 einzelne gDNA-Extrakte ergab.

Alle Proben wurden vor der Extraktion verblindet. Jede Probe wurde an den jeweiligen Standorten extrahiert, quantifiziert und normalisiert und anschließend mit dem *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit bei QIAGEN Manchester getestet.

Über alle Mutations- und WT-Proben hinweg betrug der Anteil korrekter Bestimmungen 100 %, was die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit in der präanalytischen Phase der DNA-Extraktion bekräftigt.

13.1.1.1. Störsubstanzen (analytische Spezifität)

Ziel der Studie war die Untersuchung der Auswirkungen exogener und endogener Substanzen auf die Leistung des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit. Die Studie umfasste mindestens neun Replikate für jeden Probenotyp (Vollblut und Knochenmarkaspirat) und jeden Mutationsstatus (Wildtyp, R132H und R132G) in Kombination mit jeder Störsubstanz.

Exogene Substanzen, die im DNA-Extraktionsprozess vorhanden waren, wurden getestet, indem sie nach der DNA-Extraktion und -Normalisierung dem gDNA-Eluat zugesetzt wurden. Proben, die mit potenziellen exogenen Störsubstanzen getestet wurden, wurden mit Konzentrationen versetzt, die dem höchstmöglichen Ausmaß der Verschleppung der Störsubstanz in eine Probe entsprechen. Die getesteten exogenen Substanzen umfassten:

- K2-EDTA
- Lysis Buffer (Lysepuffer)
- QIAGEN Protease
- Ethanol
- Buffer AW1
- Buffer AW2

Endogene Substanzen, einschließlich Arzneimittel und natürlich vorkommende biologische Substanzen, wurden vor der DNA-Extraktion in Vollblut- oder Knochenmarkaspiratproben gegeben. Die Testkonzentrationen wurden auf der Grundlage von C_{max} -Werten (3-fache Konzentration einer Substanz, die in der Patientenprobe erwartet wird) oder CLSI EP07-ED3-Empfehlungen bestimmt. Die getesteten endogenen Substanzen umfassten:

- Cytarabin
- Decitabin
- Etoposid

- Idarubicinhydrochlorid
- Daunorubicinhydrochlorid
- Azacitidin
- Fludarabinphosphat
- Hämoglobin
- Unkonjugiertes Bilirubin
- Cholesterin
- Albumin
- Triglyceride

Bis zu vier exogene oder vier endogene Substanzen wurden unter Verwendung eines einzigen Lösungsmittels gepoolt, und die dotierten Proben wurden mit einer Kontrollprobe verglichen, die nur das Lösungsmittel enthielt. Bei Bedarf wurden einzelne Substanzen aus einem Pool, der eine störende Wirkung gezeigt hatte, anschließend isoliert getestet.

Es wurde festgestellt, dass Cytarabin, Decitabin, Etoposid, Idarubicinhydrochlorid, Daunorubicinhydrochlorid, Azacitidin und Triglyceride die Validitätsrate von Proben mit geringer DNA-Ausgangsmenge potenziell verringern können, jedoch nicht zu fehlerhaften Ergebnissen führten.

Fludarabinphosphat, Hämoglobin, unkonjugiertes Bilirubin, Cholesterin, Albumin und alle getesteten exogenen Substanzen erfüllten die Akzeptanzkriterien und zeigten keine signifikanten Auswirkungen auf die Leistung des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

13.2. Klinische Leistung

13.2.1. Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (IDH1 Kit) wurde bei Patienten mit neu diagnostizierter AML (unter Verwendung von BMA- und PB-Proben, Tabelle 17) mit einem Next-Generation-Sequencing (NGS)-Referenztest, dem Archer VariantPlex Core Myeloid Panel (von ICON validiert), verglichen. Die diagnostische Gesamtsensitivität betrug 98,48 % (95%-Konfidenzintervall (KI) nach Clopper–Pearson (exaktes Binomialintervall): (91,84 %, 99,96 %)) und die diagnostische Spezifität betrug 100 % (95%-KI: (96,11 %, 100 %)) (Tabelle 18).

Tabelle 17. *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit vs. Referenztest (ICON NGS) bei neu diagnostizierter AML – Analyse aller Mutationen

Frequenz		Referenztest		
		IDH1 Mutation Detected	IDH1-Mutation nicht nachgewiesen	In
<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit	IDH1 Mutation Detected	65	0	65
	IDH1-Mutation nicht nachgewiesen	1	93	94
	In	66	93	159

Tabelle 18. Diagnostische Sensitivität und Spezifität bei neu diagnostizierter AML – Analyse aller Mutationen

	Häufigkeiten	Klinische Leistung	Untergrenze zweiseitiges 95%-KI	Obergrenze zweiseitiges 95%-KI
Diagnostische Sensitivität	65/66	98,48	91,84	99,96
Diagnostische Spezifität	93/93	100,00	96,11	100,00

Die Analyse der klinischen Leistung wurde auch auf Basis einzelner Mutationen durchgeführt, wie in Tabelle 19 und Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 19. *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit vs. Referenztest (ICON NGS) bei neu diagnostizierter AML – Analyse nach Mutation

Frequenz		Referenztest							
		Mutation nicht nachgewiesen	R132C	R132G	R132H	R132H und R132C	R132L	R132S	In
<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit	Mutation nicht nachgewiesen	93	1	0	0	0	0	0	94
	R132C	0	39	0	0	0	0	0	39
	R132G	0	0	5	0	0	0	0	5
	R132H	0	0	0	16	0	0	0	16
	R132H und R132C	0	0	0	0	1	0	0	1
	R132L	0	0	0	0	0	1	0	1
	R132S	0	0	0	0	0	0	3	3
	In	93	40	5	16	1	1	3	159

Tabelle 20. Diagnostische Sensitivität und Spezifität bei neu diagnostizierter AML – Analyse nach Mutation

Mutation	Diagnostische Sensitivität	Zweiseitiges 95%-KI	Diagnostische Spezifität	Zweiseitiges 95%-KI
R132C	97,6 % (40/41)	87,1 %, 99,9 %	100,00 % (118/118)	96,92 %, 100,00 %
R132G	100,0 % (5/5)	47,8 %, 100,0 %	100,00 % (154/154)	97,63 %, 100,00 %
R132H	100,0 % (17/17)	80,5 %, 100,0 %	100,00 % (142/142)	97,44 %, 100,00 %
R132L	100,0 % (1/1)	2,5 %, 100,0 %	100,00 % (158/158)	97,69 %, 100,00 %
R132S	100,0 % (3/3)	29,2 %, 100,0 %	100,00 % (156/156)	97,66 %, 100,00 %

13.3. Klinischer Nutzen/klinische Wirksamkeit des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit bei der Behandlung mit TIBSOVO in Kombination mit Azacitidin bei neu diagnostizierter AML

Es wurden Probanden aus der klinischen Studie AG120-C-009, für die Abbott RealTime IDH1 CTA-Ergebnisse vorlagen, ausgewählt, um die Konkordanz zwischen dem Abbott-Assay (CTA) und dem *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (CDx) zu bewerten. Die maximal mögliche Anzahl verbliebener, gemäß CTA- Assay IDH1- mutationspositiver Proben, die die Ein- / Ausschlusskriterien der Studie erfüllten, wurde in die Bridging-Analyse einbezogen.

Zum Datenstichtag 18. März 2021 waren 146 IDH1-mutationspositive Probanden (gemäß CTA) identifiziert und randomisiert worden, um entweder Ivosidenib (TIBSOVO) + Azacitidin (N = 72) oder Placebo + Azacitidin (N = 74) zu erhalten.

Aus diesem Full Analysis Set (FAS) wurden Probanden aus den folgenden Gründen ausgeschlossen:

- Studienabbruch: 12 Probanden; fehlende Einwilligung für zukünftige Tests: 8 Probanden
- Proben in China entnommen: 12 Probanden, Ausschluss aufgrund von Exportbeschränkungen
- Keine Restproben verfügbar: 2 Probanden

Nach diesen Ausschlüssen verblieben 112 Proben für die Bridging-Studie.

Von diesen 112 Proben waren 111 gemäß CTA IDH1-mutationspositiv und bildeten das positive Bridging-Set. Eine Probe war auf der Grundlage eines lokalen Tests randomisiert worden, war CTA-negativ und diente daher als negative Bridging-Probe. Beachten Sie, dass zwei Proben nicht auswertbar waren und zwei weitere Proben außerhalb des Workflows getestet wurden, sodass insgesamt 107 auswertbare Proben verblieben.

Zusätzlich wurde eine separate Untergruppe von CTA-negativen Probanden verwendet, um den negativen Probensatz zu erstellen. Insgesamt standen 148 CTA-negative Proben für Tests mit dem *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit zur Verfügung, um Patienten zu identifizieren, die für eine Behandlung mit Ivosidenib (TIBSOVO) plus Azacitidin infrage kommen. Darüber hinaus sollte mithilfe des IDH1 Kit die klinische Wirksamkeit ermittelt werden, die sich in einem verbesserten ereignisfreien Überleben (EFS) und anderen klinischen Ergebnissen im Einklang mit der klinischen Studie AG120-C-009 zeigte.

Die Bridging-Studie war eine nicht-interventionelle, retrospektive Analyse, bei der verbleibende BMA- und PB-Proben von Patienten mit neu diagnostizierter AML verwendet wurden. Die primären Ziele der Bridging-Studie waren die Bewertung der Konkordanz zwischen dem *ipsogen*IDH1 RGQ PCR Kit und dem Abbott CTA sowie die Prüfung der Eignung des IDH1 Kit zur Identifizierung von Patienten, die für eine Behandlung mit Ivosidenib (TIBSOVO) plus Azacitidin infrage kommen. Darüber hinaus sollte mithilfe des *ipsogen*IDH1 RGQ PCR Kit die klinische Wirksamkeit ermittelt werden, die sich in einem verbesserten ereignisfreien Überleben (EFS) und anderen klinischen Ergebnissen im Einklang mit der klinischen Studie AG120-C-009 zeigte.

Die Studienpopulation war hinsichtlich der demografischen Merkmale, der Krankheitsmerkmale und des Probentyps repräsentativ. Es wurden keine signifikanten Ungleichgewichte zwischen CDx- auswertbaren und nicht auswertbaren Probanden beobachtet.

13.4. Klinische Konkordanz

Die klinische Bridging-Studie zeigte, dass die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) und die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) den vordefinierten Konkordanzschwellenwert von $\geq 95\%$ erreichten, was die Konkordanz zwischen dem *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit und dem Abbott CTA bestätigte.

Die Konkordanzanalyse ergab folgende Ergebnisse:

- PPA: 95,33 % (102/107; 95%-KI: 89,43–98,47)
- NPA: 99,31 % (144/145; 95%-KI: 96,22–99,98)
- Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA): 97,62 % (246/252; 95%-KI: 94,89–99,12)

Tabelle 21. Konkordanz zwischen dem IDH1 Kit (CDx) und dem Abbott CTA mit CTA als Referenzmethode

CDx-Mutationsstatus		CTA-Mutationsstatus	
Frequenz	Mutation nachgewiesen	No mutation detected	In
Mutation nachgewiesen	102	1	103
No mutation detected	5	144	149
In	107	145	252

13.5. Klinische Wirksamkeit

Die klinische Wirksamkeit des *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit wurde anhand der Behandlungsergebnisse bei Patienten mit neu diagnostizierter AML beurteilt, die durch den

CDx als IDH1-mutationspositiv identifiziert worden waren. Diese Ergebnisse, einschließlich des ereignisfreien Überlebens (EFS), wurden mit der klinischen Wirksamkeit verglichen, die in der Studie AG120-C-009 beobachtet wurde, in der die Patientenauswahl mittels des Abbott RealTime IDH1 CTA erfolgte.

Tabelle 22 und Tabelle 23 zeigen das EFS für die beiden Behandlungsgruppen von AG120-C-009 basierend auf der klinischen Wirksamkeit bzw. den CDx-positiven Ergebnissen.

Tabelle 22. Ergebnisse der klinischen Studie (AG120-C-009) zum ereignisfreien Überleben (EFS) basierend auf der Wirksamkeit

	Tibsovo + Azacitidin (N = 72)	Placebo + Azacitidin (N = 74)
Probanden (%) mit Ereignissen	46 (63,9 %)	62 (83,8 %)
EFS-Rate (%) (95%-KI)		
Tag 1	41,7 % (30,2 %, 52,7 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
3 Monate	41,7 % (30,2 %, 52,7 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
6 Monate	39,9 % (28,6 %, 51,0 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
9 Monate	39,9 % (28,6 %, 51,0 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
12 Monate	37,4 % (25,9 %, 48,9 %)	12,2 % (4,3 %, 24,4 %)
18 Monate	33,3 % (20,9 %, 46,2 %)	6,1 % (0,7 %, 20,9 %)
24 Monate	22,2 % (6,6 %, 43,4 %)	0,0 % (-, -) NE*
36 Monate	0,0 % (-, -) NE	0,0 % (-, -) NE*
Hazard-Ratio (relativ zu Placebo + Azacitidin) (stratifiziert)	0,33	
95%-KI	(0,16, 0,69)	
p-Wert für HR = 1 (einseitig)	0.0011	

* NE = nicht auswertbar.

Tabelle 23. Zusammenfassung des ereignisfreien Überlebens (EFS) basierend auf den CDx-Ergebnissen für Population 1

	Tibsovo + Azacitidin (N = 50)	Placebo + Azacitidin (N = 52)
Probanden (%) mit Ereignissen	32 (64 %)	46 (88,5 %)
Patienten (%) ohne Ereignisse (zensiert)	18 (36,0 %)	6 (11,5 %)
EFS-Rate (%) (95%-KI)		
Tag 1	40,0 % (26,5 %, 53,1 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
3 Monate	40,0 % (26,5 %, 53,1 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
6 Monate	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
9 Monate	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
12 Monate	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	9,0 % (2,4 %, 21,1 %)
18 Monate	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	9,0 % (2,4 %, 21,1 %)
24 Monate	25,2 % (7,4 %, 48,2 %)	0,0 % (-, -) NE*
36 Monate	0,0 % (-, -) NE	0,0 % (-, -) NE*
Hazard-Ratio (im Vergleich zu Placebo + Azacitidin) (stratifiziert)	0,438	
95%-KI	(0,254, 0,757)	
p-Wert für HR = 1 (einseitig)	0,0016	

* NE = nicht auswertbar.

Im Vergleich zur Wirksamkeitspopulation der klinischen Studie zeigte sich bei den CDx-positiven Probanden eine gleichmäßige Aufteilung zwischen den Behandlungsgruppen, und der Prozentsatz der Ereignisse war zwischen den Gruppen im Vergleich zur Wirksamkeitspopulation der klinischen Studie ähnlich. Die Hazard-Ratio (HR) für die klinische Studie betrug 0,33 und war statistisch signifikant (0,0011) (Tabelle 22); die HR für die Wirksamkeit in der CDx-positiven Population betrug 0,438 und war ebenfalls statistisch

signifikant (0,0016) (Tabelle 23). Obwohl die CDx-HR höher ist als die Wirksamkeit in der klinischen Studie, ist dennoch eine Verbesserung gegenüber Placebo festzustellen, da sowohl die CTA- als auch die CDx-HR < 1 sind, was bedeutet, dass die Behandlung wirksam ist und beide Werte statistisch signifikant sind.

- EFS und sekundäre Endpunkte bei CDx-positiven Patienten stimmten mit den Ergebnissen der klinischen Hauptstudie überein.

Das *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit zeigte eine hohe Konkordanz mit dem Assay der klinischen Studie und identifizierte effektiv Patienten mit neu diagnostizierter AML, die für eine zielgerichtete Therapie infrage kommen.

13.6. Kurzbericht über Sicherheit und Leistung

Eine Zusammenfassung der Sicherheits- und Leistungsdaten finden Sie auf der EUDAMED-Website.

14. Literaturangaben

1. Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., ... & Su, S. M. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274), 739-744.
2. Chowdhury, R., Yeoh, K. K., Tian, Y. M., Hillringhaus, L., Bagg, E. A., Rose, N. R., ... & Kawamura, A. (2011). The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO reports*, 12(5), 463–469.
3. Pirozzi, C. J., & Yan, H. (2021). The implications of IDH mutations for cancer development and therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 18(10), 645-661.
4. Zarnegar-Lumley, S., Alonzo, T. A., Gerbing, R. B., Othus, M., Sun, Z., Ries, R. E., ... & Tarlock, K. (2023). Characteristics and prognostic impact of IDH mutations in AML: a COG, SWOG, and ECOG analysis. *Blood Advances*, 7(19), 5941-5953.
5. Bezerra, M. F., Larrazábal, B. R., Lima, A. S., Mello, M. R., Pimentel, R. F., Weinhäuser, I., ... & Lucena-Araujo, A. R. (2022). Screening for myeloid mutations in patients with myelodysplastic syndromes and AML with myelodysplasia-related changes. *Hematology, transfusion and cell therapy*, 44(3), 328-331.
6. DiNardo, C. D., Ravandi, F., Agresta, S., Konopleva, M., Takahashi, K., Kadia, T., ... & Kantarjian, H. (2015). Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *American journal of hematology*, 90(8), 732-736.
7. Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC). (Wellcome Sanger Institute). COSMIC-Datenbank. Verfügbar unter: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

15. Hilfe zur Fehlerbehebung

In der vorliegenden Hilfe zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Häufig gestellte Fragen“ unseres TechniksUPPORT-Zentrums unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus stehen Ihnen die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim Technischen Support von QIAGEN stets unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zu den Informationen und/oder Protokollen in diesem Handbuch oder den für die Proben und Assays verwendeten Methoden haben sollten (Kontaktinformationen finden Sie auf www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Kennzeichnung „NO_CT_VALUE“ (KEIN_CT-Wert) bei der Positivkontrolle (PC)

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

Kennzeichnung „UNEXPECTED_CT_VALUE“ (UNERWARTETER_CT-WERT) bei der NTC

- | | |
|---|---|
| a. Kontamination bei Vorbereitung der PCR | Stellen Sie sicher, dass der Vorbereitungsbereich dekontaminiert ist. Wiederholen Sie die PCR mit neuen Reagenzien. Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils direkt nach Zugabe der zu untersuchenden Probe. Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. |
|---|---|

Kennzeichnung „ABOVE_ACCEPTABLE_RANGE“ (OBERHALB_ZULÄSSIGEN_BEREICHS) oder „BELOW_ACCEPTABLE_RANGE“ (UNTERHALB_ZULÄSSIGEN_BEREICHS) bei der PC

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

Kennzeichnung „DNA_INPUT_TOO_HIGH“ (ZU_VIEL_AUSGANGS-DNA) beim Probenröhrchen

- | | |
|----------------------------------|---|
| a. Die Probe ist zu konzentriert | Wiederholen Sie die DNA-Quantifizierung und -Normalisierung. Die Proben sind mit dem im Kit enthaltenen Wasser (Wasser zur Verdünnung [Dil.]) zu verdünnen. |
|----------------------------------|---|

Kennzeichnungen „ABOVE_ACCEPTED_RANGE“ (OBERHALB_ZULÄSSIGEN_BEREICHS) und „NO_CT_VALUE“ (KEIN_CT-WERT) beim Probenröhrchen

- | | |
|---|---|
| a. Nicht genügend DNA-Template in der Probe | Wiederholen Sie die DNA-Quantifizierung und -Normalisierung. Die Proben sind mit dem im Kit enthaltenen Wasser (Wasser zur Verdünnung [Dil.]) zu verdünnen. Wenn der Ct-Wert der Kontrolle nach der Testwiederholung weiterhin ungültig ist, Probe erneut extrahieren. Falls der Ct-Wert der Kontrolle nach erneuter Extraktion und zwei weiteren Testläufen ungültig ist, sollte „unbestimmter Mutationsstatus“ als Ergebnis der Probe angegeben werden. |
|---|---|

16. Symbole

In der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole verwendet werden:

Symbol	Bedeutung des Symbols
 <N>	Enthält ausreichend Reagenzien für <N> Reaktionen
	Verwendbar bis
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargenbezeichnung
	Materialnummer (d. h. Kennzeichnung von Komponenten)
	Komponenten
	Enthält
	Nummer
	Internationale Artikelnummer
	Einmalige Produktkennung (Unique Device Identifier)
Rn	R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer

Symbol

Bedeutung des Symbols



Temperaturgrenzwerte



Hersteller



Gebrauchsanweisung beachten



Vor Sonneneinstrahlung schützen



Warnung/Vorsicht



Gesundheitsgefahr



Umgebung

17. Kontakt

Technische Unterstützung und weitere Informationen finden Sie in unserem TechniksUPPORT-Zentrum unter support.qiagen.com.

18. Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.- Nr.
<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit	Für 24 Reaktionen: IDH1-Reaktionsgemisch 1, IDH1-Reaktionsgemisch 2, IDH1-Positivkontrolle, Taq-Polymerase, Wasser für NTC, Wasser zur Probenverdünnung	675223
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit – zur Aufreinigung genomischer DNA aus Vollblut oder Knochenmarkaspirat		
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: 50 QIAamp Mini Spin Columns, QIAGEN Proteinase, Puffer, Collection Tubes (2 ml)	61104
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM und Zubehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-Thermocycler und hochauflösender Schmelzanalysator mit 5 Kanälen (Grün, Gelb, Orange, Rot, Dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop-Computer, Software, Zubehör: inklusive 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeitsleistung sowie auf Installation und Schulung	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Plattform	Real-time PCR-Thermocycler und hochauflösender Schmelzanalysator mit 5 Kanälen (Grün, Gelb, Orange, Rot, Dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop-Computer, Software, Zubehör: inklusive 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeitsleistung sowie auf Installation und Schulung	9002032
Loading Block 72 × 0.1 mL Tubes	Aluminiumblock für die manuelle Reaktionseinrichtung mit einer Ein-kanalpipette in 72 × 0,1-ml-Röhrchen	9018901
72-Well Rotor	Zur Aufnahme der Strip Tubes and Caps, 0.1 mL, für Reaktionsvolumina von 10–50 µl; erfordert Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Zur Befestigung der Strip Tubes and Caps, 0.1 mL im 72-Well Rotor	9018904
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln für 1.000 Reaktionen	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 × 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln für 10.000 Reaktionen je 10–50 µl	981106

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie in der Gebrauchsanweisung für das jeweilige QIAGEN Kit. Gebrauchsanweisungen für QIAGEN Kits sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Support von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

19. Revisionsverlauf des Dokuments

Revision	Beschreibung
R1, Juni 2026	Erstveröffentlichung

Eingeschränkte Lizenzvereinbarung für das *ipsogen*® IDH1 RGQ PCR Kit

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

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und dieser Gebrauchsanweisung bereitgestellten Protokollen und nur mit den im Panel enthaltenen Komponenten verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer geistigen Eigentumsrechte keine Lizenz zur Verwendung oder Kombination der Komponenten dieses Panels mit anderen Komponenten, die nicht in diesem Panel enthalten sind, mit Ausnahme der Anwendungen, die in den mit dem Produkt bereitgestellten Protokollen, dieser Gebrauchsanweisung sowie zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN weder gründlich getestet noch optimiert. QIAGEN übernimmt weder eine Garantie noch eine Gewähr dafür, dass sie die Rechte Dritter nicht verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN ist berechtigt, die Untersagungen in dieser begrenzten Lizenzvereinbarung vor einem beliebigen Gericht einzuklagen und wird alle seine Untersuchungs- und Gerichtskosten, einschließlich der Anwaltsgebühren, in jedwedem Verfahren zur Durchsetzung dieser begrenzten Lizenzvereinbarung oder seiner geistigen Eigentumsrechte an dem Panel und/oder seinen Komponenten zurückfordern.

Aktualisierte Lizenzbedingungen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, QIAcube®, Rotor-Gene®, QIAamp®, Rotor-Gene AssayManager®, HotStarTaq® (QIAGEN-Gruppe); TaqMan® (Roche-Gruppe), TIBSOVO® (Servier Pharmaceuticals LLC). Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

06/2026 HB-3744-001 © 2026 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

