



Rev. 01, junio de 2026

Instrucciones de uso del *ipsogen*[®] IDH1 RGQ PCR Kit

IVD

Para uso en diagnóstico in vitro

Para uso con el instrumento Rotor-Gene Q[®] MDx 5plex HRM

Para uso con el QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit

Estas instrucciones de uso sirven para:



REF

Versión

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit

24 muestras

675223

Versión 1



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

Índice

1. Uso previsto	4
2. Usuario previsto	5
3. Descripción y principio	6
3.1. Resumen y explicación	6
3.2. Principio del procedimiento	7
3.3. Plataforma y software	10
4. Materiales suministrados	12
4.1. Contenido del kit	12
4.2. Componentes del kit	13
5. Materiales necesarios pero no suministrados	16
5.1. Reactivos adicionales	16
5.2. Consumibles	16
5.3. Equipo	16
6. Advertencias y precauciones	18
6.1. Advertencias	18
6.2. Información de seguridad	18
6.3. Precauciones	19
7. Eliminación	21
8. Almacenamiento y manipulación	22
8.1. Almacenamiento y manipulación de los reactivos	22
8.2. Manipulación y almacenamiento de muestras	23
9. Protocolo: preparación de la muestra	25
10. Protocolo: detección de mutaciones en IDH1	28
10.1. Antes de comenzar	29
11. Interpretación de los resultados	50
12. Limitaciones	58
13. Características del rendimiento	60
13.1. Rendimiento analítico	60
13.2. Rendimiento clínico	73

13.3. Utilidad/eficacia clínica del kit ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit con el tratamiento con TIBSOVO en combinación con azacitidina en LMA de diagnóstico reciente	75
13.4. Concordancia clínica	77
13.5. Eficacia clínica	77
13.6. Resumen de seguridad y rendimiento	80
14. Referencias	81
15. Guía para la resolución de problemas	82
16. Símbolos	84
17. Información de contacto	86
18. Información para pedidos	87
19. Historial de revisiones del documento	89

1. Uso previsto

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit es un ensayo de PCR en tiempo real cualitativo para la detección de variantes de nucleótido único (SNV) que codifican cinco mutaciones de IDH1 (R132C, R132H, R132G, R132S y R132L), utilizando ADN genómico extraído de muestras humanas frescas o congeladas de sangre total o aspirado de médula ósea recogidas en tubos con K2-EDTA de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA).

La prueba está destinada a utilizarse como producto sanitario de diagnóstico complementario para ayudar a los médicos a identificar a los pacientes con LMA que pueden ser aptos para el tratamiento con TIBSOVO® (ivosidenib) basándose en la detección de una mutación de IDH1. TIBSOVO puede administrarse en combinación con azacitidina, de acuerdo con sus indicaciones aprobadas. La prueba no está destinada a orientar las decisiones de tratamiento con azacitidina.

Las muestras humanas frescas o congeladas de sangre total o aspirado de médula ósea, recogidas en tubos con K2-EDTA, se procesan manualmente utilizando el QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

El instrumento QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM se utiliza para la amplificación y detección automatizadas.

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit no es un dispositivo automatizado; no obstante, el análisis se realiza mediante un software específico.

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit debe utilizarse por personal debidamente formado en un entorno de laboratorio profesional.

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit está indicado para diagnóstico in vitro.

2. Usuario previsto

Para su uso con el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de cat. 61104) mediante el procedimiento manual de aislamiento y purificación del ADN genómico por microcentrifugación.

El producto solo debe ser utilizado por personal cualificado en un entorno de laboratorio profesional.

3. Descripción y principio

3.1. Resumen y explicación

La isocitrato deshidrogenasa 1 es una enzima codificada por el gen IDH1 del cromosoma 2 en seres humanos. Las isocitrato deshidrogenasas de tipo natural catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato a 2-oxoglutarato. Las mutaciones en puntos calientes de IDH1 en R132 provocan mutaciones con ganancia de función que dan lugar a la producción de D-2-hidroxiglutarato (2HG) (1). El 2HG es un oncometabolito implicado en la hipermetilación del ADN y de las histonas que provoca la desregulación de la transcripción génica y el bloqueo de la diferenciación celular (2, 3). Las mutaciones de IDH1 están presentes en neoplasias hematológicas, principalmente en la LMA (aproximadamente 15–25 %) (4), pero también en síndromes mielodisplásicos (SMD, aproximadamente 2–7 %) (5, 6).

El *ipsogen*® IDH1 RGQ PCR Kit es un ensayo para la detección e identificación de cinco mutaciones específicas en el codón 132 del gen IDH1 (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de mutaciones e identificadores COSMIC

Mutación	Cambio de base	ID de COSMIC*
R132H	395G>A	COSV61615239
R132C	394C>T	COSV61615256
R132S	394C>A	COSV61615649
R132G	394C>G	COSV61615456
R132L	395G>T	COSV61615420

* Los ID de COSMIC se han extraído del *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (7) (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

3.2. Principio del procedimiento

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit se basa en la detección mediante amplificación selectiva de cinco mutaciones de IDH1 en ADN genómico (ADNg) extraído de muestras de sangre total o aspirado de médula ósea (AMO). La tecnología de alelo específico permite una detección precisa y altamente reproducible de las mutaciones de IDH1 objetivo, basándose en el uso de conjuntos de sondas y cebadores directos e inversos específicos; los cebadores específicos para la mutación se unen selectivamente al ADN objetivo, lo que favorece la extensión y amplificación en la reacción de PCR.

Los informes de resultados están totalmente automatizados. Si tanto los controles de la serie como los resultados de las muestras son válidos, y la amplificación de la diana del ensayo es inferior al umbral de corte predeterminado, el informe mostrará las mutaciones de IDH1 detectadas en cada muestra.

3.2.1. Purificación del ADN

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit se ha validado para su uso con ADN extraído de muestras de sangre total y AMO utilizando el QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit, siguiendo el procedimiento de aislamiento y purificación manual de ADN genómico mediante microcentrifuga. No utilice ningún otro producto de extracción de ADN y no utilice ni el QIAcube® ni sistemas de vacío para extraer ADN con el QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

El procedimiento manual en microcentrifuga del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit consta de 4 pasos. En primer lugar, las muestras se lisan en condiciones desnaturalizantes a temperaturas elevadas. La lisis se realiza en presencia de QIAGEN® Protease (QP) y el tampón de lisis (AL). A continuación, cada lisado se aplica a una columna de centrifugación QIAamp Mini y el ADN genómico se adsorbe en la membrana de sílice a medida que el lisado la atraviesa por fuerza centrífuga. Mientras el ADN genómico permanece unido a la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini, los contaminantes se eliminan

eficazmente mediante tampones de lavado. Finalmente, el ADN genómico se eluye de la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini con 200 µL de tampón de elución (AE). El ADN eluido está listo para su uso con *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

3.2.2. PCR en tiempo real

El uso de la PCR en tiempo real permite la detección de los productos de reacción durante la fase exponencial del proceso de amplificación por PCR, en lugar de al final del mismo, como ocurre con la PCR de punto final. Esto aumenta la especificidad de la prueba y reduce el tiempo necesario para realizar el proceso de análisis.

El ensayo utiliza el principio de reacción de hidrólisis de oligonucleótidos mediante PCR en tiempo real con sondas TaqMan®. Se utilizan tres tipos de oligonucleótidos para detectar cada secuencia de bases diana: un par de cebadores de PCR convencionales que son complementarios a las secuencias en sentido ascendente y descendente de la secuencia diana y forman un amplicón de PCR, y una molécula de sonda que es complementaria a la secuencia diana exacta e incorpora tanto un colorante indicador fluorescente como un supresor de fluorescencia en estrecha proximidad.

Durante la PCR, si la secuencia diana de interés está presente, la sonda de oligonucleótidos se hibridará con ella, mientras que los cebadores de la PCR se hibridarán con sus secuencias complementarias en sentido ascendente y descendente de la región de unión de la sonda. En la fase de extensión del cebador de la reacción, la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa *Thermus aquaticus* (Taq) escinde el oligonucleótido de la sonda, liberando tanto la molécula del indicador fluorescente como las del supresor. A medida que estos se difunden entre sí hacia la solución, el efecto del supresor sobre el informador disminuye, lo que lleva a un aumento de la fluorescencia detectable. Este proceso ocurre en cada ciclo de PCR y no interfiere con la acumulación exponencial del producto (Figura 1).

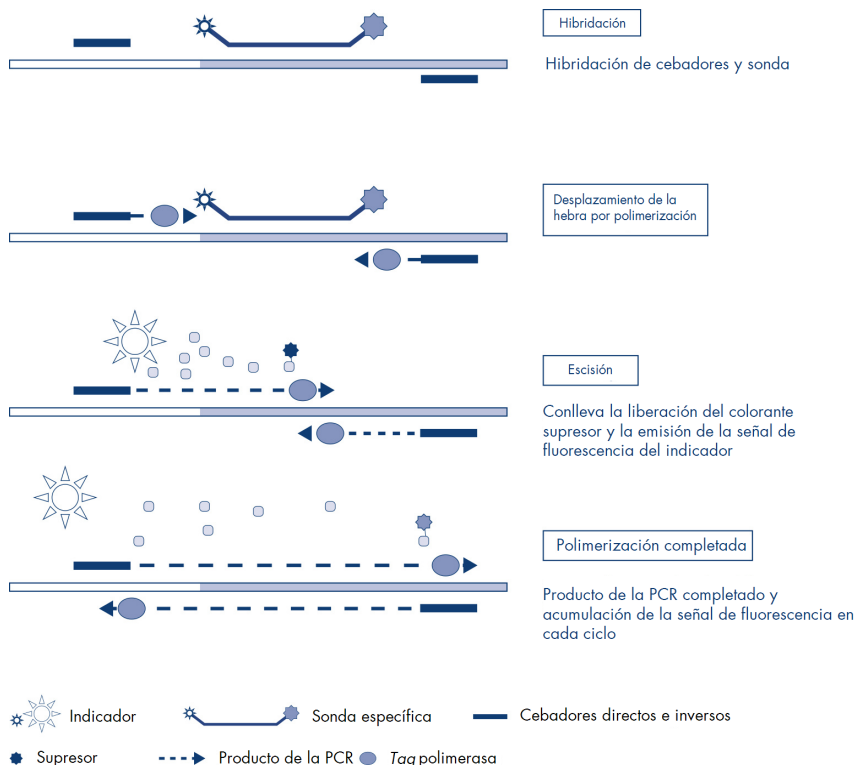


Figura 1. Principio de reacción en tiempo real TaqMan.

El aumento de la señal de fluorescencia se detecta únicamente si la secuencia diana, complementaria a los cebadores y la sonda, está presente en la reacción. Si la secuencia diana no está presente, no se producirá una escisión de la sonda ni una disociación del fluoróforo indicador del supresor y, por lo tanto, no se observará un aumento de la fluorescencia.

El número de ciclos de PCR necesarios para detectar una señal fluorescente por encima de un umbral predeterminado se denomina umbral de ciclo (Ct) y es directamente proporcional a la

cantidad de diana presente al comienzo de la reacción, lo que permite establecer un límite de sensibilidad para la prueba.

Cada ensayo de mutación IDH1 contiene un cebador alelo-específico que se une selectivamente a secuencias de ADN que contienen la mutación. Un error de emparejamiento en el extremo 3' del cebador específico para el alelo (p. ej., en presencia de una secuencia de tipo natural o de una mutación diferente) reduce la eficacia de la extensión del cebador, aumentando así la especificidad para la mutación designada.

La especificidad para las mutaciones IDH1 R132 aumenta aún más mediante el uso de bloqueadores de la PCR. En las mezclas de reacción de la PCR se incluyen oligonucleótidos complementarios a la secuencia de ADN de tipo natural. En presencia de ADN de tipo natural, los bloqueadores oligonucleotídicos se hibridan selectivamente con el ADN e inhiben el reconocimiento de las secuencias de tipo natural por parte de los cebadores específicos para alelo de mutación.

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit contiene ADN polimerasa HotStarTaq®, una forma modificada de la ADN Taq polimerasa de QIAGEN. Se suministra en un estado inactivo y no contiene actividad enzimática a temperatura ambiente. Esto previene la formación de productos y dímeros de cebadores cebados incorrectamente durante la configuración de la reacción y el primer paso de desnaturalización. Por lo tanto, los artefactos de la PCR no compiten por los reactantes, lo cual permite una alta especificidad de la PCR. La enzima se activa al inicio de la reacción mediante un paso de incubación de 15 minutos a 95 °C. El inicio rápido permite configurar las reacciones rápida y cómodamente a temperatura ambiente.

3.3. Plataforma y software

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit está diseñado específicamente para su uso con:

- Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRMPlatform* (n.º de cat. 9002032 [plataforma] o 9002033 [sistema]), que funciona con un ordenador personal con lo siguiente instalado:
 - Software Rotor-Gene AssayManager® v2.1 (versión 2.1.1 o posterior) (n.º de cat. 9024203)
 - Gamma Plug-in versión 1.0 (o posterior) (n.º de cat. 9025511)
 - Perfil de ensayo *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit («AP_*ipsogen*_IDH1_Blood_BMA_V1_0_x.iap» donde $x \geq 0$)

Nota: el perfil de ensayo *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit solo es compatible con Rotor-Gene AssayManager v2.1 o posterior.

Consulte los manuales de usuario individuales correspondientes para obtener información sobre el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application o el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in.

El instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM debe someterse a mantenimiento de acuerdo con los requisitos del manual de usuario.

Importante: antes de su uso, asegúrese de que los instrumentos se han verificado y calibrado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

*Antes de usar el producto, asegúrese de que los instrumentos se hayan verificado y calibrado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4. Materiales suministrados

4.1 . Contenido del kit

<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit			
Número de catálogo			675223
Número de pruebas			24
Reactivo	Color de la tapa	ID de tubo	Volumen
IDH1 Reaction Mix 1	Verde	IDH1 Mix 1	950 µL
IDH1 Reaction Mix 2	Morado	IDH1 Mix 2	950 µL
IDH1 Positive Control	Rojo	PC	120 µL
ADN Taq polimerasa	Menta	Taq	85 µL
Agua para NTC	Blanco	NTC	1,9 mL
Agua para la dilución de la muestra	Blanco	Dil.	1,9 mL

No se incluyen accesorios con el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

4.2. Componentes del kit

Reactivo	Componentes críticos/activos/reactivos	Intervalo de concentración
IDH1 Reaction Mix 1 y IDH1 Reaction Mix 2	Oligonucleótidos específicos de la diana: cebadores	0,1–1 µM
	Oligonucleótidos específicos de la diana: sondas de detección marcadas con fluoróforos	0,1–1 µM
	Bloqueador de la PCR de oligonucleótidos IDH1	0,1–2 µM
	Trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP)	<1 mM
IDH1 Positive Control	Plásmidos de ADN que contienen secuencias específicas de la diana	<100.000 copias/µL
ADN Taq polimerasa	ADN Taq polimerasa	1–10 unidades

Nota: el dispositivo contiene componentes adicionales que pueden influir en las mediciones.

4.2.1. Mezclas de reacción

IDH1 Reaction Mix 1 e IDH1 Reaction Mix 2 contienen reactivos para realizar reacciones de PCR que detectan las mutaciones de IDH1 indicadas en Tabla 1.

Cada mezcla de reacción también amplifica una reacción de control, tal como se describe a continuación.

4.2.2. Reacción para el control

La reacción de control utiliza un cebador directo y otro inverso, así como una sonda marcada, para detectar la amplificación de una secuencia conservada ajena a IDH1. La reacción de control se utiliza para determinar si existe un nivel adecuado de ADN

amplificable en la muestra y constituye un factor en los cálculos analíticos que determinan el estado de mutación.

La diana de control se utiliza para definir una muestra como mutación IDH1 detectada o no detectada, y como control de carga de ADN. Todas las muestras darán una señal en la reacción de control en un intervalo de Ct predefinido si se ha añadido suficiente ADN al tubo de reacción.

4.2.3. IDH1 Positive Control

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit también contiene IDH1 Positive Control. El control positivo es una mezcla de plásmidos de ADN que representa cada una de las mutaciones detectadas por el kit. La detección del control positivo tiene como objetivo comprobar el correcto funcionamiento de cada una de las mezclas de reacción del kit.

4.2.4. Control negativo

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit contiene agua exenta de nucleasas para el control sin molde (tubo NTC) que se utilizará para la reacción de «control sin molde». El control sin molde se utiliza como control negativo para valorar la posible contaminación durante la preparación del ensayo.

4.2.5. ADN Taq polimerasa

La ADN polimerasa Taq es la enzima para la reacción en cadena de la polimerasa utilizada por el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

4.2.6. Agua para la dilución de la muestra

Se utiliza un tubo adicional que contiene agua exenta de nucleasas, si es necesario, para diluir el ADN que esté demasiado concentrado para el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

5. Materiales necesarios pero no suministrados

5.1. Reactivos adicionales

- QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de cat. 61104, consulte la sección «Purificación del ADN»)
- Soluciones de degradación de PCR DNAZap™ o soluciones de limpieza equivalentes
- Desinfectante de laboratorio de alto nivel Distel y lavado con alcohol isopropílico (IPA) o solución de limpieza equivalente

5.2. Consumibles

- Tubos y tapones en tiras (0,1 mL), para uso con rotor de 72 pocillos (n.º de cat. 981103 o 981106)
- Tubos de microcentrifugadora libres de nucleasas y de baja unión al ADN para la preparación de mezclas maestras
- Puntas de pipeta libres de nucleasas con filtros para aerosoles

5.3. Equipo

- Plataforma y software, tal como se describen en la página "Plataforma y software" en la página 10
- Marcador permanente
- Pipetas exclusivas* (ajustables) para la preparación de muestras
- Pipetas exclusivas* (ajustables) para la preparación de la mezcla maestra para PCR

* Antes de su uso, asegúrese de que los instrumentos se hayan verificado y calibrado siguiendo las recomendaciones.

- Pipetas exclusivas* (ajustables) para la dispensación de ADN del molde
- Centrifugadora de sobremesa* con rotor para tubos de 1,5 mL
- Termomezclador*, incubador orbital térmico*, bloque calefactor* o baño de agua* con capacidad de incubación a 37 °C y 56 °C
- Bloque de carga para 72 tubos de 0,1 mL, bloque de aluminio para la preparación manual de las reacciones (n.º de cat. 9018901)
- Rotor de 72 pocillos, para alojar tubos y tapones en tiras de 0,1 mL, con volúmenes de reacción de 10–50 µL; requiere el rotor de 72 pocillos con anillo de bloqueo
- Rotor de 72 pocillos con anillo de bloqueo, para fijar los tubos y tapones en tiras en el rotor de 72 pocillos 0,1 mL (n.º de cat. 9018904)
- Instrumento de cuantificación espectrofotométrica *
- Agitador vórtex de mesa

* Antes de su uso, asegúrese de que los instrumentos se hayan verificado y calibrado siguiendo las recomendaciones.

6. Advertencias y precauciones

Tenga en cuenta que es posible que deba consultar la normativa local de cara a la notificación de incidentes graves que se hayan producido en relación con el dispositivo al fabricante o a su representante autorizado y la autoridad reguladora correspondiente al lugar de residencia del usuario o del paciente.

6.1. Advertencias

Para uso diagnóstico in vitro.

Para uso con Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform.

Para uso con el QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit mediante el procedimiento manual de aislamiento y purificación de ADN genómico por microcentrifugación.

6.2. Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Están disponibles en línea en un formato PDF práctico y compacto en www.qiagen.com/safety, donde puede encontrar, ver e imprimir las SDS de cada kit de QIAGEN y de sus componentes.

- Los materiales de muestra y las muestras son potencialmente infecciosos. Elimine las muestras y los residuos del ensayo de acuerdo con sus procedimientos de seguridad locales.
- Para obtener información de seguridad relativa al instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, consulte el manual de usuario suministrado con el instrumento.

- Para obtener información de seguridad sobre el QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de cat. 61104), consulte el *Manual del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit*.

6.2.1. Información para emergencias

CHEMTREC

Fuera de EE. UU. y Canadá +1 703-527-3887

6.3. Precauciones

El usuario debe cumplir siempre las siguientes precauciones al utilizar el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit:

ADN Taq polimerasa



Contiene: nonilfenol etoxilado. Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. Evitar su emisión en el medio ambiente. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. Recoger los vertidos. Eliminar el contenido o el recipiente en un centro autorizado conforme a las normativas locales, federales, estatales e internacionales.

- La prueba está indicada para su uso con muestras de sangre total o aspirado de médula ósea recogidas en tubos K2-EDTA.
- Todos los materiales químicos y biológicos son potencialmente peligrosos. Los materiales de muestra son material potencialmente infeccioso y deben tratarse como material biopeligroso.
- Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los procedimientos de seguridad local.
- Los reactivos para el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit están diluidos óptimamente. No debe realizarse una mayor dilución de los reactivos, puesto que pueden perder eficacia. No utilice volúmenes de reacción (mezcla de reacción más muestra) inferiores a 25 µL.

- Todos los reactivos del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit se han formulado específicamente para su uso con las pruebas proporcionadas en el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.
- Todos los reactivos suministrados en el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit están previstos para utilizarse únicamente con los demás reactivos suministrados en el mismo *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit. No sustituya los reactivos del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ni entre distintos *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kits, ya que esto puede afectar al rendimiento.
- Utilice únicamente la ADN polimerasa Taq (tubo Taq) suministrada en el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit. No la sustituya por la ADN polimerasa Taq de otros kits del mismo o de cualquier otro tipo, ni por la ADN polimerasa Taq de otro proveedor.
- Consulte el *Manual del usuario de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform* para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales.
- Instale el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM de acuerdo con los procedimientos de instalación y los requisitos del centro.
- No utilice componentes caducados o mal almacenados.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación de los reactivos de control y de la mezcla de reacción con los materiales sintéticos contenidos en el reactivo de control positivo.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación cruzada entre muestras. Tape los tubos rápidamente tras añadir cada muestra.
- Descontamine a fondo el bloque de carga antes de utilizarlo para la preparación de las mezclas maestras. Se recomienda el uso de soluciones de degradación de PCR DNAZap, seguido del desinfectante de laboratorio de alto nivel Distel y un lavado con alcohol isopropílico. El bloque de carga debe estar seco antes de su uso.
- Utilice pipetas individuales exclusivas para preparar las mezclas de reacción y añadir reactivos para el control positivo.

- Lleve a cabo la preparación y dispensación de las mezclas de reacción en una área diferente de la utilizada para añadir el control positivo.
- Las moléculas marcadas con fluorescencia incluidas en los reactivos de la mezcla de reacción son sensibles a la luz. Proteja los reactivos de control y de la mezcla de reacción de la luz para evitar el blanqueamiento.
- No abra el instrumento Rotor-Gene Q MDx hasta que la serie haya finalizado.
- No abra los tubos Rotor-Gene Q hasta que haya finalizado la serie. Si se produce un error durante la serie, las muestras del instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM deben desecharse y no volver a analizarse.
- Es importante controlar que las pruebas de las muestras se realicen correctamente para evitar la introducción incorrecta de muestras, los errores de carga y los errores de pipeteo.
- Para minimizar los avisos para los controles y las muestras, se deben seguir estrictamente las *instrucciones de uso del ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit*, lo que incluye, entre otros, los siguientes puntos:
 - Se requiere una mezcla correcta de los reactivos, lo cual debe garantizarse en cada paso de mezcla durante la preparación del ensayo.

7. Eliminación

Deseche los residuos de las muestras y los ensayos conforme a los procedimientos de seguridad locales.

8. Almacenamiento y manipulación

8.1. Almacenamiento y manipulación de los reactivos

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit se envía en hielo seco y debe estar aún congelado a su llegada. Si el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit no está congelado a su llegada, si el embalaje exterior se ha abierto durante el transporte o si el envío no contiene un albarán de entrega o los reactivos, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de QIAGEN o con sus distribuidores locales (visite www.qiagen.com).

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit debe almacenarse inmediatamente tras su recepción a una temperatura de entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un congelador de temperatura constante. El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit debe protegerse de la luz para evitar el fotoblanqueamiento y la pérdida de rendimiento. Cuando se almacena en las condiciones especificadas, el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el embalaje exterior.

En estas condiciones, los componentes son estables durante 11 meses sin mostrar ninguna reducción del rendimiento ni de la calidad, a menos que se indique lo contrario en la etiqueta.

No es aconsejable descongelarlo y volver luego a congelarlo. No se debe superar un máximo de 3 ciclos de congelación-descongelación en un máximo de 90 días. Los reactivos deben descongelarse por completo a temperatura ambiente ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante un mínimo de 30 minutos antes de su uso. Los reactivos deben volver a guardarse en el congelador en un plazo de 4 horas tras su extracción.

Los reactivos del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit están diluidos de forma óptima y no se requiere ninguna purificación o tratamiento adicional antes de su uso en el análisis, tal como se indica en las *instrucciones de uso del ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit* (este documento).

Nota: se debe prestar atención a las fechas de caducidad y a las condiciones de almacenamiento indicadas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados o mal almacenados.

8.1.1. Estabilidad en uso

No lo utilice si se ha conservado fuera de los valores especificados, si el embalaje se ha dañado o si se ven otros signos de deterioro o fallo de funcionamiento.

Una vez abiertos, los reactivos pueden almacenarse en su embalaje original a una temperatura de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 días, o hasta la fecha de caducidad indicada en el embalaje, lo que ocurra antes.

8.2. Manipulación y almacenamiento de muestras

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit está indicado para su uso con muestras de sangre total (ST) o aspirado de médula ósea (AMO) humanas, frescas o congeladas, recogidas en tubos K2-EDTA.

Todas las muestras deben tratarse como potencialmente peligrosas. Deseche los residuos de las muestras y los ensayos conforme a los procedimientos de seguridad locales.

8.2.1. Obtención y almacenamiento de muestras

Las muestras de sangre total y de aspirado de médula ósea deben recogerse en tubos K2-EDTA siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras deben transportarse de acuerdo con la norma ISO 20658:2023 y deben cumplir las condiciones de almacenamiento (incluidos los ciclos máximos de congelación-descongelación) descritas a continuación en esta sección para garantizar la calidad de las muestras. El ADN puede almacenarse tras la extracción, antes de la realización de las pruebas.

A continuación se describen las condiciones de almacenamiento recomendadas para las muestras:

- Si se refrigeran, hasta 7 días a 2–8 °C.
- Si se congelan, hasta 3 semanas para las muestras de sangre completa y hasta 9 semanas para las muestras de AMO a una temperatura de entre –30 °C y –15 °C. No supere un máximo de dos ciclos de congelación-descongelación para las muestras de sangre completa o AMO.

A continuación se describen las condiciones de almacenamiento recomendadas para el ADNg:

- Si se refrigeran, hasta 2 semanas a 2–8 °C.
- Si se congelan, hasta 9 semanas a una temperatura de entre –30 °C y –15 °C.

8.2.2. Sustancias interferentes en las muestras

Las sustancias presentes en las muestras de sangre total o de aspirado de médula ósea podrían afectar al rendimiento del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

Se evaluó el impacto de posibles sustancias interferentes; consulte la sección «Características del rendimiento» para obtener más detalles y una lista de las sustancias analizadas. Se observó interferencia con los siguientes agentes: citarabina, decitabina, etopósido, clorhidrato de idarrubicina, clorhidrato de daunorrubicina, azacitidina y triglicéridos.

9. Protocolo: preparación de la muestra

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea «Advertencias y precauciones».
- Asegúrese de que todos los materiales necesarios pero no suministrados estén disponibles (consulte la página "Materiales necesarios pero no suministrados" en la página 16).
- Asegúrese de que todos los reactivos y consumibles se almacenen correctamente y no hayan caducado.
- Asegúrese de que todos los equipos se hayan revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

Purificación del ADN

La purificación del ADN debe realizarse de acuerdo con las instrucciones del protocolo de extracción manual en microcentrífuga del *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook*.

Nota: utilice 200 µL de sangre entera o aspirado de médula ósea para la extracción. Asegúrese de que las muestras se mezclen bien (por ejemplo, por inversión) antes de la extracción.

Nota: el ADN se debe eluir con 200 µL de tampón de elución (AE).

Nota: el kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit se ha desarrollado para su uso con el QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit con el protocolo de extracción manual en microcentrífuga. Para garantizar un rendimiento óptimo, no se permite el uso de otros productos de extracción, protocolos o sistemas automatizados.

Cuantificación y normalización del ADN

El ADN_g extraído de muestras de sangre total o de aspirado de médula ósea debe cuantificarse (p. ej., utilizando un instrumento de cuantificación espectrofotométrica) de acuerdo con los procedimientos locales.

Nota: asegúrese de utilizar el tampón de elución correcto para calibrar el instrumento de cuantificación.

- Si la concentración medida es ≥ 1 y ≤ 6 ng/ μ L, no es necesaria la normalización de la muestra.
- Si la concentración medida es inferior a 1 ng/ μ L, la muestra debe volver a extraerse.
- Si la concentración medida es superior a 6 ng/ μ L, la muestra debe diluirse a 5 ng/ μ L utilizando el agua para dilución (Dil.) proporcionado en el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, según la fórmula:

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

donde:

- C_i : Concentración inicial del ADN_g extraído
- C_f : Concentración final deseada = 5 ng/ μ L
- V_f : Volumen final necesario para realizar un ciclo de PCR *ipsogen* IDH1 RGQ (es decir, 10 μ L + volumen adicional para errores de pipeteo)
- V_i : Volumen inicial del ADN_g extraído que se debe pipetear y diluir con el Agua para dilución (Dil.) suministrada en el kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit

Nota: volumen de agua que se debe añadir al ADN_g extraído = $V_f - V_i$

Nota: utilice el tubo de agua para dilución (Dil.) suministrado para diluir la muestra, si es necesario.

Ejemplo práctico

- Por ejemplo, si la concentración de ADNg medida es de 20 ng/μL, el volumen que se debe añadir al ADNg puede determinarse como se indica a continuación:
 - $C_i = 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ [o según se haya medido]
 - $C_f = 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ [valor fijo]
 - $V_f = 15 \mu\text{L}$ [volumen suficiente con exceso para las reacciones de PCR]
 - V_i se calcula de la siguiente forma:

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

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

- El volumen de agua que se debe añadir se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Volumen de agua para añadir} = V_f - V_i = 15 - 3,75 = 11,25 \mu\text{L}$$

Pipetee 11,25 μL de agua para dilución en un tubo adecuado. Añada 3,75 μL de muestra de ADNg y, a continuación, mezcle bien.

10. Protocolo: detección de mutaciones en IDH1

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea «Advertencias y precauciones».
- Asegúrese de que todos los materiales necesarios pero no suministrados estén disponibles (consulte la página "Materiales necesarios pero no suministrados" en la página 16).
- Asegúrese de que todos los reactivos y consumibles se almacenen correctamente y no hayan caducado.
- Antes de iniciar el protocolo, familiarícese con el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Consulte los manuales de usuario del instrumento, de Rotor-Gene AssayManager v2.1 y del complemento Gamma para obtener más información.
- Asegúrese de que todos los equipos se hayan revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.
- No agite en vórtex la ADN polimerasa Taq (Taq), ya que esto podría inactivar la enzima.
- Pipetee la ADN polimerasa Taq (Taq) colocando la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra con un exceso de enzima.
- Antes de comenzar, se deben configurar los siguientes ajustes desde la pestaña de configuración (Figura 2 y Figura 3).

Finish run

☐ Run has to be released before starting approval
☐ Release of run has to be signed

Figura 2. Asegúrese de que las casillas de verificación «Run has to be released before starting approval» (La ejecución debe ser liberada antes de comenzar la aprobación) y «Release of run has to be signed» (La autorización para ejecutar la carrera debe estar firmada) no estén marcadas.

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	UDT mode
☐ Material number required	☐ Material number required
☒ Valid expiry date required	☐ Valid expiry date required
☒ Lot number required	☐ Lot number required

Figura 3. Asegúrese de que la casilla «Material number required» (Número de material requerido) no esté marcada.

10.1. Antes de comenzar

- Antes de cada uso, descongele todos los reactivos, excepto la Taq ADN polimerasa (Taq) y las muestras, a temperatura ambiente (15–25 °C) durante al menos 30 minutos. Agite en un vórtex durante 5–12 segundos para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo. Vuelva a colocar las mezclas de reacción IDH1, el PC y el NTC en el congelador (de –30 °C a –15 °C) en un plazo de 4 horas desde el inicio del proceso de descongelación.

Nota: saque la ADN polimerasa Taq solo cuando los reactivos se hayan descongelado.

- Asegúrese de que las muestras que se van a analizar estén completamente descongeladas y bien mezcladas.
- Descargue e instale todo el software necesario. Para obtener más información sobre la instalación del software, consulte la sección «Instalación del complemento Gamma e importación del perfil de ensayo» en la página siguiente.

- Software Rotor-Gene AssayManager v2.1 (versión 2.1.1 o posterior) (n.º de cat. 9024203)
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in v1.0 (o posterior) (n.º de cat. 9025511)
- *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile

10.1.1. Instalación del complemento Gamma e importación del perfil de ensayo

Para obtener información detallada sobre la instalación del software principal Rotor-Gene AssayManager v2.1, consulte el *Manual de usuario de la aplicación principal Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx*.

La instalación y la importación del complemento Gamma y del perfil de ensayo se detallan en el *Manual de usuario de la aplicación principal Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx*.

1. Descargue el complemento Gamma del sitio web de QIAGEN (www.qiagen.com).
2. Inicie el proceso de instalación haciendo doble clic en el archivo `RGAM_V2_1_Gamma__Plug-in.Installation.v1_0_x.msi` (donde x es ≥ 0) y siguiendo las instrucciones de instalación. Para obtener una descripción detallada de este proceso, consulte la sección «Instalación de complementos» del *Manual de usuario de la aplicación principal Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx*.
3. Tras instalar correctamente el complemento, una persona con derechos de administrador para el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 deberá importar la última versión del perfil de ensayo de la siguiente manera.
 - a. Abra el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 haciendo clic en el siguiente icono.



Se abre la ventana siguiente:

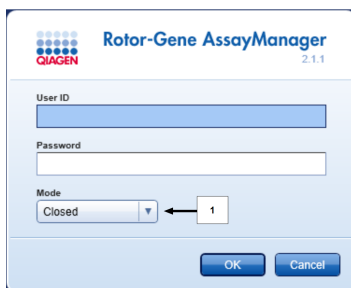


Figura 4. Rotor-Gene AssayManager V2.1.

- b. Inicie sesión en el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 con su ID de usuario y su contraseña. No cambie el modo «Closed» (Cerrado). Haga clic en **OK** (Aceptar). Se abre la ventana siguiente:

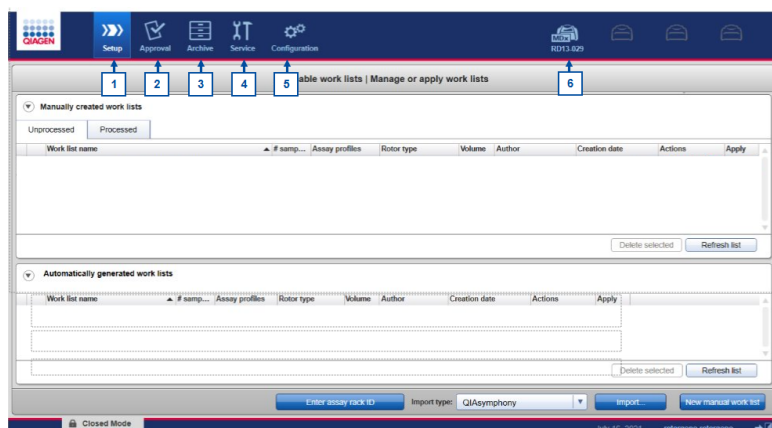


Figura 5. Rotor-Gene AssayManager v2.1.1. 1: Pestaña Setup (Ajustes). Esta pestaña permite gestionar o aplicar tareas. **2: Pestaña Approval (Aprobación).** Esta pestaña le permite buscar experimentos anteriores. **3: Pestaña Archive (Archivo).** Esta pestaña permite buscar experimentos anteriores ya aprobados. **4: Pestaña Service (Servicio).** En esta pestaña se incluye un registro de auditoría de cada archivo generado por el software. **5: Pestaña Configuration (Configuración).** Esta pestaña permite configurar todos los parámetros del software. **6: Icono de Rotor-Gene Q (RGQ).**



- c. Seleccione el entorno de configuración.
- d. Seleccione la pestaña **Assay Profiles** (Perfiles de ensayo).
- e. Haga clic en **Import** (Importar).
- f. Seleccione el perfil de ensayo que se va a importar en el cuadro de diálogo y, a continuación, haga clic en **Open** (Abrir).
- g. Una vez que el perfil de ensayo se haya importado correctamente, se podrá utilizar en el entorno «Setup» (Ajustes).

Nota: no se puede importar dos veces la misma versión de un perfil de ensayo.

10.1.2. Procedimiento

1. Descongele todos los reactivos, excepto la ADN polimerasa Taq (Taq), a temperatura ambiente (15-25 °C) durante un mínimo de 30 minutos y un máximo de 2 horas antes de su uso.

Nota: saque la ADN polimerasa Taq solo cuando los reactivos se hayan descongelado.

Nota: vuelva a introducir las mezclas de reacción IDH1, el PC y el NTC en el congelador (de -30 °C a -15 °C) antes de que transcurran 4 horas desde el inicio del proceso de descongelación.

Nota: se recomienda volver a introducir las mezclas de reacción IDH1 y la Taq en el congelador (de -30 °C a -15 °C) inmediatamente después de preparar las mezclas maestras.

2. Mezcle todos los reactivos, excepto la Taq, agitando en vórtex durante 5–12 segundos para evitar concentraciones localizadas de sales y, a continuación, centrifúguelos brevemente para recoger el contenido en el fondo del tubo.

Nota: la ADN polimerasa Taq (Taq) no debe agitarse en vórtex.

Nota: el tiempo total desde el inicio de la configuración de la PCR hasta el inicio del análisis no debe superar las 2 horas.

3. Prepare suficientes mezclas maestras (mezclas de reacción IDH1 más ADN polimerasa Taq [Taq]) para las muestras de ADN, una reacción de control positivo y una reacción de control sin molde (NTC) según los volúmenes indicados en Tabla 3 y Tabla 4.

Nota: incluya reactivos para $n + 2$ muestras adicionales a fin de que exista un excedente suficiente para la preparación de la PCR.

Nota: el número máximo de corridas utilizando el número óptimo de muestras para el uso con el Kit PCR *ipsogen* IDH1 RGQ es de tres corridas de ocho muestras por corrida.

Nota: la mezcla maestra contiene todos los componentes necesarios para la PCR, excepto la muestra y los controles.

4. Devuelva las mezclas de reacción IDH1 y la Taq al congelador (de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) inmediatamente después de preparar las mezclas maestras.:

Tabla 2. Número de reacciones para el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM con rotor de 72 pocillos

Muestras	Reacción
Con la IDH1 Master Mix 1	
24 muestras de ADNg	24 reacciones
Control positivo (PC)	1 reacción
Control sin molde (NTC)	1 reacción
Con la IDH1 Master Mix 2	
24 muestras de ADNg	24 reacciones
Control positivo (PC)	1 reacción
Control sin molde (NTC)	1 reacción

Tabla 3. Preparación de la IDH1 Master Mix 1 (MM1)*

Componente	Volumen
IDH1 Reaction Mix 1	$19,6\text{ }\mu\text{L} \times (n + 2)^*$
ADN Taq polimerasa (Taq)	$0,4\text{ }\mu\text{L} \times (n + 2)^*$
Volumen total	20,0 μL/reacción

* n = número de reacciones (muestras más controles). Al preparar la mezcla maestra, prepare la cantidad suficiente para dos muestras adicionales ($n + 2$) para permitir un excedente suficiente para la preparación de la PCR.

Tabla 4. Preparación de IDH1 Master Mix 2 (MM2)*

Componente	Volumen
IDH1 Reaction Mix 2	19,6 $\mu\text{L} \times (n + 2)^*$
Taq ADN polimerasa (Taq)	0,4 $\mu\text{L} \times (n + 2)^*$
Volumen total	20,0 μL/reacción

* n = número de reacciones (muestras más controles). Al preparar la mezcla maestra, prepare la cantidad suficiente para dos muestras adicionales (n + 2) para permitir un excedente suficiente para la preparación de la PCR.

- 5. Mezcle bien la mezcla maestra mediante agitación en vórtex durante 5–12 segundos y, a continuación, centrifugue brevemente para recoger el contenido en el fondo del tubo.
- 6. Coloque el número adecuado de tubos en tiras para PCR de 0,1 mL en el bloque de carga según el esquema de Tabla 5.

Nota: mantenga los tubos de PCR en el bloque de carga hasta que finalice la preparación de la reacción de PCR. Esto reduce la probabilidad de errores durante la preparación de la PCR.

- 7. Añada inmediatamente 20 μL de mezcla maestra a cada tubo en tiras de PCR de 0,1 mL (no suministrado).

Nota: añada MM1 y MM2 en filas alternas.

Nota: no tape los tubos. Los tapones permanecen en el contenedor de plástico hasta que son necesarios.

- 8. Añada inmediatamente 5 μL de agua para el control sin molde (NTC) a los tubos de control sin molde (números de tubo de PCR 3 y 4).

Nota: asegúrese de que el tubo de agua para el control sin molde (NTC) se utilice para el NTC. El tubo de agua para dilución de muestra no debe utilizarse como NTC.

- 9. Tape los tubos que contienen el NTC (tubos de PCR números 3 y 4).

Tabla 5. Disposición de las pruebas de muestras en el bloque de carga (los números denotan las posiciones en el bloque de carga e indican la posición final del rotor)

Mezcla

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

10. Añada 5 µL de cada muestra a los tubos de muestras (p. ej., tubos de PCR números 5–52).
11. Tape los tubos que contienen las muestras.
12. Añada 5 µl de control positivo (PC) de IDH1 a los tubos de control positivo (tubos de PCR números 1 y 2).
13. Tape los tubos que contienen el PC.

14. Con un rotulador permanente, marque las tapas de los tubos para indicar la dirección de carga de los tubos en el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
15. Una vez tapados todos los tubos de PCR, realice una comprobación visual de los niveles de llenado de los tubos de muestra para asegurarse de que se ha añadido muestra a todos los tubos.
16. Coloque los tubos en tiras de PCR en las posiciones adecuadas del rotor de 72 pocillos (Tabla 5). Si el rotor no está totalmente lleno, debe rellenar todas las posiciones vacías con un tubo tapado vacío.
17. Coloque inmediatamente el rotor de 72 pocillos en el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Asegúrese de que el anillo de cierre (accesorio del instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) esté colocado sobre el rotor para fijar los tubos durante el análisis.

Realización de un ciclo de análisis de mutaciones de IDH1

1. El kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit debe utilizarse en el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. El software Rotor-Gene AssayManager v2.1 y el complemento Gamma deben estar instalados antes de su uso.
2. El software base Rotor-Gene AssayManager v2.1 y el complemento Gamma disponen cada uno de un manual de usuario independiente. Para obtener instrucciones de instalación, consulte las secciones «Instalación de Rotor-Gene AssayManager v2.1» e «Instalación de complementos» del *Manual del usuario de la aplicación principal Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx*.
3. El perfil de ensayo de *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit debe importarse en Rotor-Gene AssayManager antes de su uso. Para obtener instrucciones, consulte la sección «Instalación del complemento Gamma e importación del perfil de ensayo» en la página "Instalación del complemento Gamma e importación del perfil de ensayo" en la página 30. El perfil de ensayo contiene todos los parámetros necesarios para ejecutar una serie de PCR y realizar el análisis automático y la interpretación de los resultados.

4. Debe instalarse un visor de PDF para ver los informes de ejecución generados por Rotor-Gene AssayManager.

En las siguientes instrucciones se detalla la configuración de una serie de análisis de mutaciones de IDH1 utilizando el software Rotor-Gene AssayManager v2.1. Para ver instrucciones avanzadas, consulte los manuales del usuario correspondientes.

5. Abra el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 haciendo doble clic en el icono del escritorio (Figura 6).



Figura 6. Icono de escritorio de Rotor-Gene AssayManager.

6. En la pantalla de inicio de sesión de Rotor-Gene AssayManager (Figura 7), introduzca el ID de usuario y la contraseña, seleccione el modo **Closed** (Cerrado) y haga clic en **OK** (Aceptar). A continuación, se abrirá la ventana principal de Rotor-Gene AssayManager.

La imagen muestra la interfaz de inicio de sesión de Rotor-Gene AssayManager. En la parte superior izquierda hay un logo de QIAGEN con una cuadrícula de puntos azules. Al lado del logo, el texto "Rotor-Gene AssayManager" y la versión "2.1.1.1". Debajo, hay tres campos de entrada: "User ID" (un campo azul), "Password" (un campo blanco) y "Mode" (un menú desplegable con "Closed" seleccionado). En la parte inferior derecha hay dos botones: "OK" y "Cancel".

Figura 7. Pantalla de inicio de sesión de Rotor-Gene AssayManager.

7. Seleccione **New manual work list** (Nueva lista de trabajo manual) en la ventana principal para crear una nueva lista de trabajo (Figura 8, indicado por el recuadro 1).

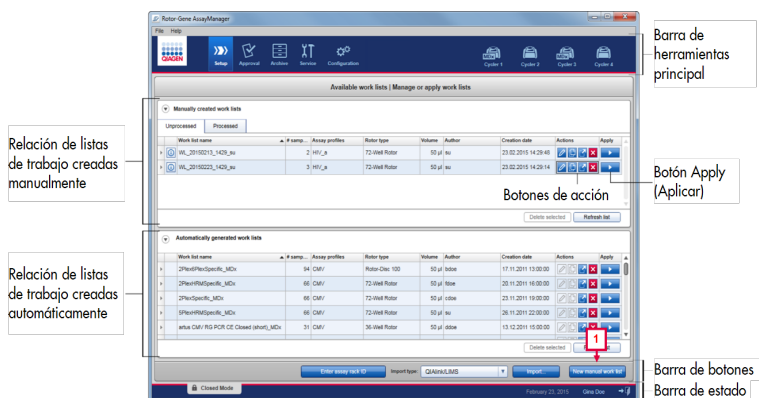


Figura 8. Ventana principal de Rotor-Gene AssayManager. El recuadro 1 indica el botón **New manual work list** (Nueva lista de trabajo manual).

8. Para realizar una ejecución de IDH1, asegúrese de que esté seleccionada la pestaña **Assays** (Ensayos). Haga clic en el perfil de ensayo **ipsogen_IDH1_Blood_BMA** en la ventana «Available assay profiles» (Perfiles de ensayo disponibles) (Figura 9, indicado por el recuadro 1) y haga clic en la **flecha azul** para seleccionar el perfil de ensayo (Figura 9, indicado por el recuadro 2). Mueva el puntero del ratón sobre el perfil de ensayo para ver el nombre completo si es necesario. El perfil de ensayo debería aparecer ahora en la ventana «Selected assay profiles» (Perfiles de ensayo seleccionados) (Figura 9).

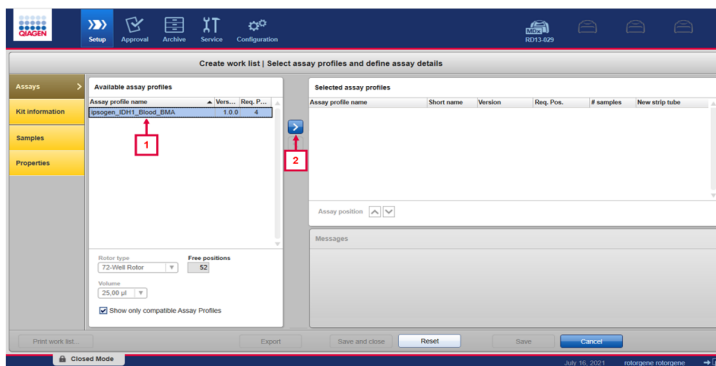


Figura 9. Ventana «Create work list» (Crear lista de trabajo). El recuadro 1 indica el perfil de ensayo que se debe seleccionar. El recuadro 2 indica cómo seleccionar el perfil de ensayo elegido.

9. En la ventana «Selected assay profiles» (Figura 10, indicada por el recuadro 1), introduzca el número de muestras que se van a analizar (excluyendo los controles). A continuación, haga clic en la pestaña **Samples** (Muestras) para introducir la «sample information» (información de la muestra) (Figura 10, indicada por el recuadro 2).

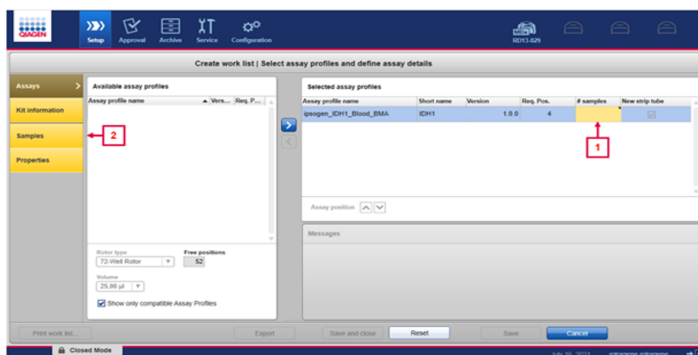


Figura 10. Ventana «Create work list» en la pestaña «Assays». El recuadro 1 indica dónde añadir el número de muestras. El recuadro 2 indica la pestaña Samples.

10. Introduzca los nombres de las muestras en la columna «Sample ID» (ID de muestra) (Figura 11, indicado por el recuadro 1). Introduzca cualquier comentario en la columna «Comments» (Comentarios). A continuación, haga clic en la pestaña **Properties** (Propiedades) (Figura 11, indicada por el recuadro 2).

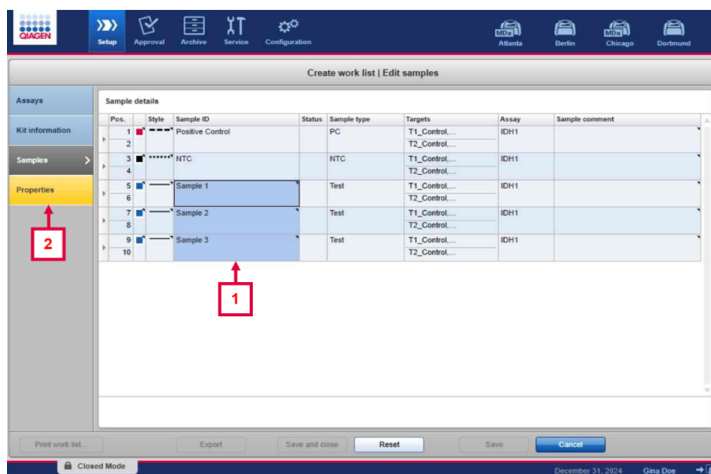


Figura 11. Ventana «Create work list» en la pestaña «Samples». El recuadro 1 indica la columna Samples ID. El recuadro 2 indica la pestaña Properties.

11. Introduzca un nombre de lista de trabajo en el cuadro de texto «Work list name» (Nombre de la lista de trabajo) y marque la casilla «work list is complete» (can be applied) (la lista de trabajo está completada [puede aplicarse]) (Figura 12, indicado por los recuadros 1 y 2). Haga clic en **Apply** (Aplicar) para aplicar la lista de trabajo (Figura 12, indicado por el recuadro 3).

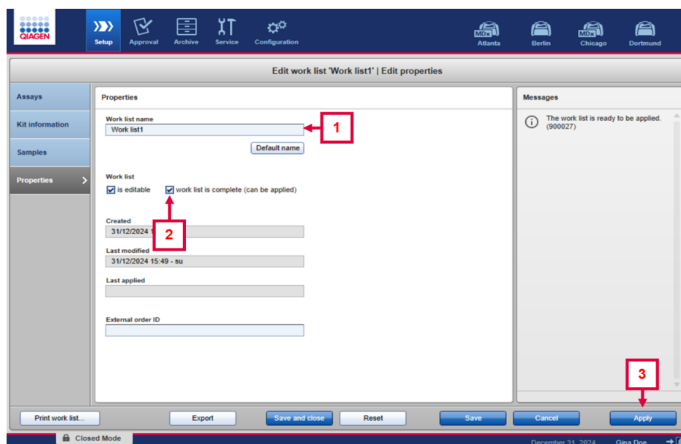


Figura 12. Ventana «Create work list» en la pestaña «Properties». El recuadro 1 indica dónde escribir el nombre de la lista de trabajo. El recuadro 2 indica la casilla de verificación «worklist complete» (lista de trabajo completada). El recuadro 3 indica el botón **Apply** (Aplicar).

12. Introduzca un nombre para el experimento en el cuadro de texto «Experiment name» (Nombre del experimento) (Figura 13, indicado por el recuadro 1). Asegúrese de que se haya seleccionado el termociclador correcto y de que se haya marcado la casilla de verificación «Ring attached» (Anillo colocado) (Figura 13, indicado por los recuadros 2 y 3). Haga clic en **Start run** (Iniciar serie) para continuar (Figura 13, indicado por el recuadro 4).

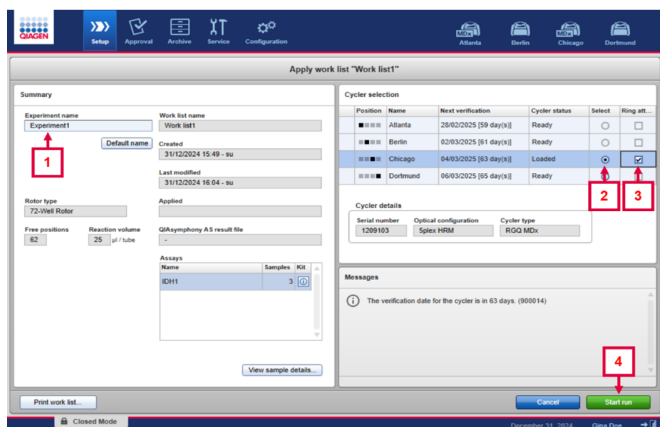


Figura 13. Ventana «Apply work list» (Aplicar lista de trabajo). El **recuadro 1** indica dónde añadir el nombre del experimento. Los **recuadros 2 y 3** indican dónde seleccionar el termociclador correcto y confirmar que se ha colocado el anillo. El **recuadro 4** indica el botón **Start run** (Iniciar serie).

- Al finalizar, haga clic en **Finish run** (Finalizar serie) para liberar y aprobar el análisis (Figura 14, indicado por el recuadro 1).

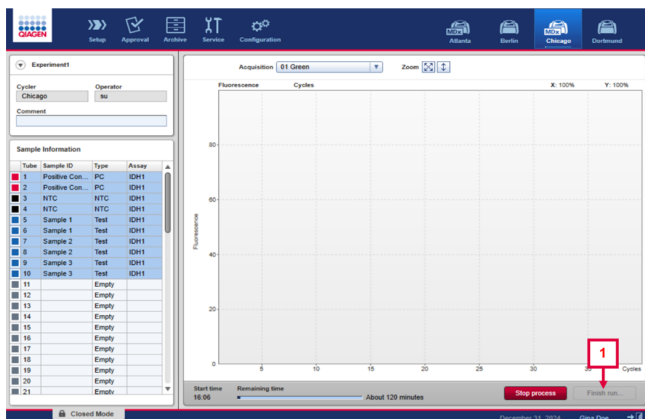


Figura 14. Ejemplo de la ventana «Cycler Environment» (Entorno del termociclador). El recuadro 1 muestra el botón Finish run.

14. Para ver la información del análisis y los resultados del ensayo IDH1, haga clic en **Release and go to approval** (Liberar e ir a aprobación) (Figura 15). Esto también libera el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, que queda listo para el siguiente análisis.



Figura 15. Cuadro de diálogo «Finish Run».

15. El perfil de ensayo `ipsogen_IDH1_Blood_BMA` contiene todas las reglas para el análisis automático del ensayo y de la muestra, así como para la interpretación de los resultados. Por lo tanto, el software evaluará automáticamente la validez o falta de validez de las

muestras y de los controles.

Nota: para obtener más información sobre la interpretación de los resultados del ensayo, consulte la sección «Interpretación de los resultados».

16. Los datos procesados, la información del experimento, el ensayo y la información de la pista de auditoría se pueden encontrar en la ventana «Plots and information» (gráficos e información). Los resultados del ensayo se pueden encontrar en la ventana «Assay Results» (Resultados del ensayo). Si los resultados del control positivo y del control sin molde se encuentran dentro de un rango aceptable, la columna «Overall sample result» (Resultado general de la muestra) indicará «valid» (válido) (Figura 16); de lo contrario, aparecerá un resultado «INVALID» (no válido) (Figura 17)

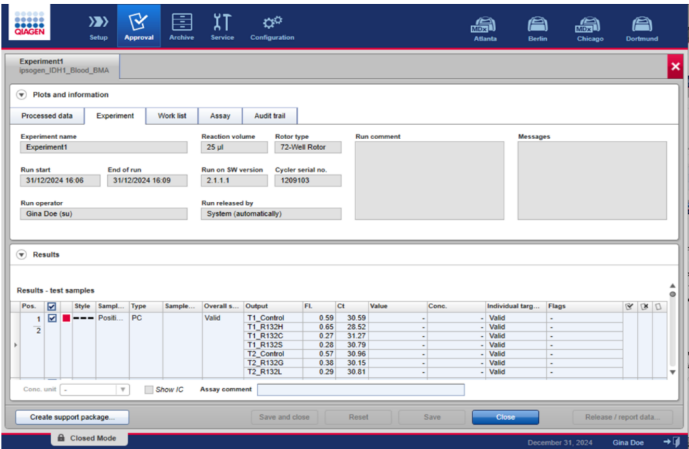


Figura 16. Ventana «Assay Results» válida.

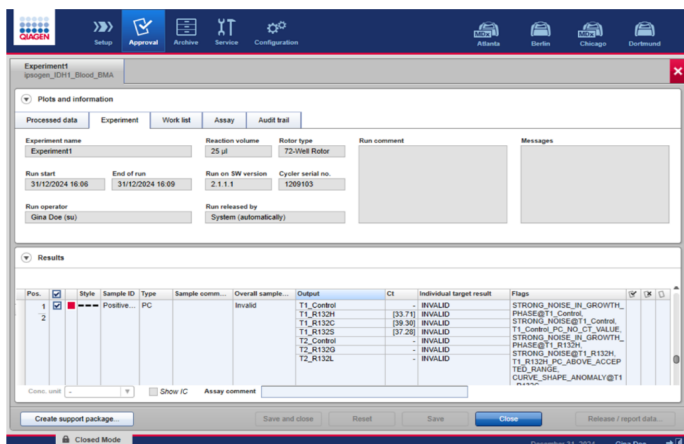


Figura 17. Ventana «Assay Results» no válida.

- Si los resultados del control de muestras se hallan dentro del rango aceptable, en la columna «Overall sample result» se informará «No Mutation Detected» (No se detectó ninguna mutación) o «IDH1 Mutation Detected» (Se detectó una mutación de IDH1) (Figura 18). Esto indica que la concentración de ADN de la muestra es adecuada para realizar el análisis de mutaciones.

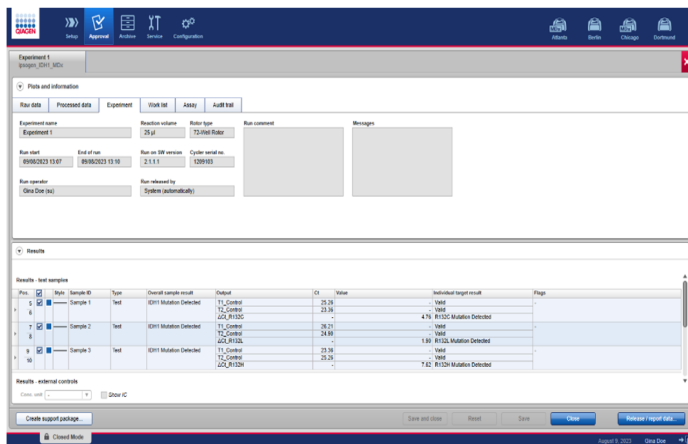


Figura 18. Ventana de resultados de las muestras.

18. Haga clic en **OK** para guardar el experimento en el archivo y crear una salida de LIMS y un informe de ejecución (Figura 19). Los informes de la serie y los archivos exportados del LIMS se guardarán en el directorio de informes predeterminado. El directorio predeterminado se encuentra en los directorios de exportación de datos de la pestaña «Configuration».

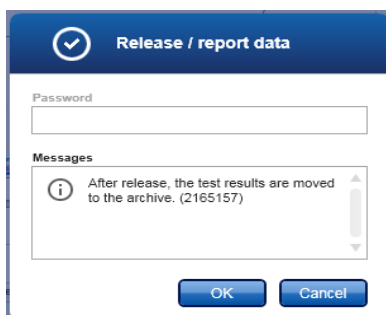


Figura 19. Cuadro de diálogo «Release/report data» (Publicar/generar informe).

19. Aparecerá el cuadro de diálogo «Status of release» (Estado de la publicación). Haga clic en **OK** para aceptar (Figura 20).

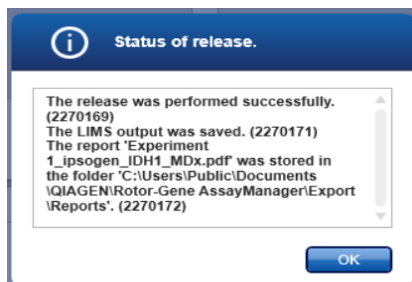


Figura 20. Cuadro de diálogo «Status of release».

20. Los experimentos publicados ahora se pueden extraer del entorno «Archive» (Archivo). Para buscar un experimento, haga clic en la pestaña **Archive** e introduzca los criterios de búsqueda necesarios.

11. Interpretación de los resultados

El análisis y la identificación de mutaciones se realizan automáticamente mediante el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 utilizando el perfil de ensayo *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit una vez finalizada la ejecución, y no requieren interpretación manual.

La siguiente información explica cómo se realizan el análisis y la identificación de mutaciones.

Análisis e identificaciones de mutaciones

El ciclo de PCR en el que la fluorescencia de una reacción determinada cruza el valor umbral predefinido proporcionado por el perfil de ensayo *ipsogen_IDH1_Blood_BMA* se define como el valor de Ct. Los valores de Ct indican la cantidad de ADN de entrada específico. Los valores de Ct bajos indican niveles de ADN de entrada más altos y los valores de Ct altos indican niveles de ADN de entrada más bajos. Para cada ensayo de mutación de IDH1, se realiza un cálculo para determinar el valor ΔCt utilizando la ecuación:

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

Basándose en los valores analíticos predeterminados de Ct y ΔCt , el *ipsogen_IDH1_Blood_BMA* perfil de ensayo determina cualitativamente el estado de mutación de las muestras de ADN e informa si una muestra contiene una o más de las mutaciones IDH1 especificadas.

Se evalúan los controles (PC, NTC, control de la muestra) para garantizar que se cumplan los valores de Ct aceptables y que las reacciones se hayan realizado correctamente.

Si los valores de Ct están fuera del rango aceptable, se obtiene un resultado «INVALID» y se informa de uno o más indicadores. Para obtener más información, consulte la sección «Indicadores del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile» en la página siguiente. Por

ejemplo, si el Ct del control de la muestra está por debajo del rango aceptable, esto significa que la cantidad de ADN de entrada es demasiado alta y la muestra debe diluirse.

Nota: el estado de mutación de IDH1 no se notifica en caso de muestra no válida o de serie no válida.

El software Rotor-Gene AssayManager v2.1 determina el resultado de cada objetivo combinando todos los resultados de análisis pertinentes conforme a algoritmos de análisis principales, tales como la normalización y las reglas de muestras y de ensayos definidas en el perfil de ensayo correspondiente.

Los siguientes resultados pueden asignarse en una muestra individual:

- IDH1 Mutation Detected (Detección de mutación de IDH1)
- No Mutation Detected (Mutación no detectada)
- INVALID (NO VÁLIDO): si el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 asigna a la muestra durante el análisis uno o más indicadores definidos para establecer el resultado del objetivo como «INVALID».

Nota: si se ha producido un error durante la serie, las muestras en el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM deben desecharse y no volver a analizarse.

Indicadores del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile

Los indicadores correspondientes al Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in que no son específicos únicamente de este *ipsogen_IDH1_Blood_BMA* perfil de ensayo se enumeran en Tabla 6.

Tabla 6. Indicadores relacionados con el Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in

Marcador	Descripción	Acción
ANALYSIS_FAILED (ensayo erróneo)	El ensayo se ha definido como no válido porque el análisis ha sido erróneo.	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de QIAGEN.
ASSAY_INVALID (ensayo no válido)	La muestra no es válida debido a que al menos un control externo no es válido.	Repetir serie. Consulte Tabla 7.
CONSECUTIVE_FAULT (fallo consecutivo)	Una diana utilizada para el cálculo de esta diana no es válida.	No se requiere ninguna acción adicional
CURVE_SHAPE_ANOMALY (anomalía en forma de curva)	La curva de amplificación de datos sin procesar muestra una forma que se desvía del comportamiento establecido para este ensayo. Existe una probabilidad elevada de resultados incorrectos o de una interpretación errónea de los resultados.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.
FLAT_BUMP (badén aplanado)	La curva de amplificación muestra una forma similar a un badén aplanado que se desvía del comportamiento establecido para este ensayo. Existe una alta probabilidad de que se produzcan resultados incorrectos o una interpretación errónea de los resultados (p. ej., determinación incorrecta del valor de Ct).	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (traspaso de umbral múltiple)	La curva de amplificación excede el umbral en más de una ocasión. No se puede determinar un valor de Ct único.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.

Marcador	Descripción	Acción
NO_BASELINE (ninguna referencia)	No se ha encontrado ninguna referencia inicial. No se puede realizar el análisis posterior.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.
OTHER_TARGET_INVALID (otro analito no válido)	Otro analito para la misma muestra no es válido.	No se requiere ninguna acción adicional
RUN_FAILED (serie errónea)	Invalid Assay (ensayo no válido) se ha definido como no válido debido a un problema con el termociclador o la conexión del termociclador.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.
RUN_STOPPED (serie detenida)	Invalid Assay (ensayo no válido) se ha definido como no válido porque la serie se ha detenido manualmente.	Repetir serie.
SATURATION (saturación)	La fluorescencia de los datos sin procesar presenta una saturación elevada antes del punto de inflexión de la curva de amplificación.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de QIAGEN si aparece este indicador durante la repetición de la prueba.
SPIKE (pico)	Se detecta un pico en la fluorescencia de los datos brutos en la curva de amplificación, pero fuera de la región en la que se determina el Ct.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de QIAGEN si aparece este indicador durante la repetición de la prueba.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (pico próximo a CT)	Se detecta un pico en la curva de amplificación cerca del valor de Ct.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.

Marcador	Descripción	Acción
STEEP_BASELINE (referencia abrupta)	Se ha detectado una referencia inicial con crecimiento abrupto para la fluorescencia de los datos sin procesar en la curva de amplificación.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.
STRONG_BASELINE_DIP (caída abrupta de la referencia)	Se ha detectado un descenso abrupto en la referencia para la fluorescencia de los datos sin procesar en la curva de amplificación.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.
STRONG_NOISE (ruido fuerte)	Se ha detectado una señal de ruido fuerte fuera de la fase de crecimiento de la curva de amplificación.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (ruido fuerte en la fase de crecimiento)	Se ha detectado una señal de ruido fuerte en la fase de crecimiento (exponencial) de la curva de amplificación.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (fluorescencia de base ondulante)	Se ha detectado una referencia inicial ondulante para la fluorescencia de los datos sin procesar en la curva de amplificación.	Repetir la prueba. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si este indicador aparece durante la repetición de la prueba.

En las Tabla 7 y Tabla 8 se enumeran los posibles indicadores que puede generar el perfil de ensayo *ipsogen*_IDH1_Blood_BMA, junto con sus significados y las acciones que deben llevarse a cabo.

Los nombres de los marcadores se generan de manera que proporcionen información sobre el componente afectado del kit, la muestra o el control afectados y el modo del error.

Por ejemplo:

T1_Control1_PC_NO_CT_VALUE = El control positivo (PC), el ensayo de control para el tubo 1 no tiene valor de Ct

Consulte también la sección «Guía para la resolución de problemas».

Tabla 7. Indicadores de software utilizados por el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile para el CP y el NTC

Marcador	Significado	Acción
T1_<target>_PC_NO_CT_VALUE o T2_<target>_PC_NO_CT_VALUE	Secuencia analítica no válida. Sin valor de Ct para el PC.	Repetir serie.
T1_<target>_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE o T2_<target>_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Secuencia analítica no válida. PC por encima del intervalo de especificación.	Repetir serie.
T1_<target>_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE o T2_<target>_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Secuencia analítica no válida. PC por debajo del intervalo de especificación.	Repetir serie.
T1_<target>_ NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE o T2_<target>_NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE	Secuencia analítica no válida. Se ha detectado un valor de Ct en el NTC.	Repetir serie.

Tabla 8. Indicadores de software utilizados por el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile para muestras

Marcador	Significado	Acción
T1_Control1_DNA_ INPUT_TOO_HIGH (Control de ADN de entrada demasiado alto en T1) o bien T2_Control1_DNA_INPUT_TOO_HIGH (Control de ADN de entrada demasiado alto en T2)	Muestra no válida. Valor de Ct del control de muestra por debajo del rango de trabajo del control.	Repita la cuantificación y normalización del ADN. Tras repetir la prueba, si el valor de Ct del control sigue siendo no válido, vuelva a extraer la muestra. Si el valor de Ct del control no es válido tras la reextracción y otras dos rondas de pruebas, se debe informar de que la muestra tiene un estado de mutación indeterminado.

Marcador	Significado	Acción
T1_Control_ABOVE_ACCEPTED_RANGE (Control por encima del intervalo aceptado en T1) o bien T2_Control_ABOVE_ACCEPTED_RANGE (Control por encima del intervalo aceptado en T2)	Muestra no válida. El valor de Ct del control de la muestra está por encima del intervalo de trabajo del control.	Repita la cuantificación y normalización del ADN. Tras repetir la prueba, si el valor de Ct del control sigue siendo no válido, vuelva a extraer la muestra. Si el valor de Ct del control no es válido tras la reextracción y otras dos rondas de pruebas, se debe informar de que la muestra tiene un estado de mutación indeterminado.
T1_Control_NO_CT_VALUE (Control sin valor de CT en T1) o bien T2_Control_NO_CT_VALUE (Control sin valor de CT en T2)	Muestra no válida. No hay valor de Ct en la muestra.	Repita la cuantificación y normalización del ADN. Tras repetir la prueba, si el valor de Ct del control sigue siendo no válido, vuelva a extraer la muestra. Si el valor de Ct del control no es válido tras la reextracción y otras dos rondas de pruebas, se debe informar de que la muestra tiene un estado de mutación indeterminado.

Nota: si una muestra que se vuelve a analizar no es válida por un motivo diferente al repetir la prueba, esto se sigue clasificando como una segunda repetición y se debe realizar una reextracción de la muestra. Consulte Figura 21 para obtener información sobre los procedimientos de repetición de pruebas y reextracción.

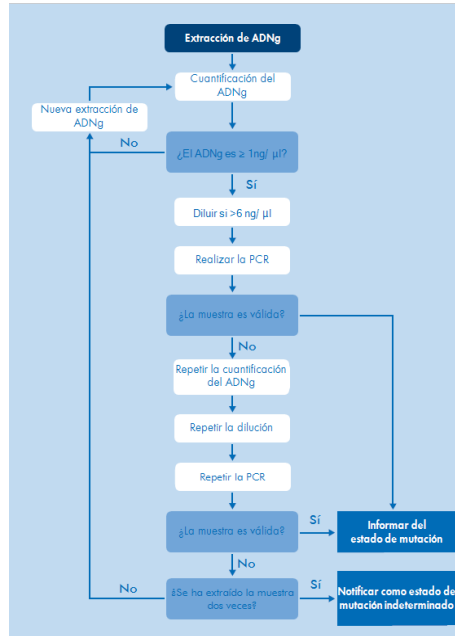


Figura 21. Diagrama de flujo del procedimiento de repetición de pruebas de la muestra.

12. Limitaciones

La prueba no está destinada a utilizarse como dispositivo de diagnóstico complementario para ayudar a los médicos a identificar a pacientes con colangiocarcinoma localmente avanzado o metastásico que puedan ser aptos para el tratamiento con TIBSOVO en función de la detección de una mutación de IDH1.

La detección de las mutaciones depende de la integridad de la muestra y del volumen de ADN amplificable que contiene el material de muestra.

La prueba está diseñada para detectar cinco mutaciones en el codón 132 del gen IDH1. Es posible que las muestras con un resultado «no mutation detected» (mutación no detectada) incluyan mutaciones de IDH1 que no se pueden detectar con este ensayo.

El kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit utiliza un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Al igual que con todos los procedimientos de PCR, las muestras pueden contaminarse con fuentes externas de ADN del entorno del análisis y con ADN del control positivo. Extreme la precaución para evitar la contaminación de las muestras y los reactivos de la mezcla de reacción.

El kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit solo debe utilizarse con muestras de sangre total y aspirado de médula ósea recogidas en tubos K2-EDTA.

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit solo debe utilizarse con el QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Es necesario el cumplimiento estricto del *Manual del ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit* para obtener resultados óptimos. No se recomienda la dilución de reactivos distintos a los descritos en este manual. De lo contrario, el rendimiento se verá disminuido.

El kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit solo puede utilizarse si se emplean conjuntamente todos los componentes de reacción del mismo lote del kit.

El producto está indicado únicamente para su uso en el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM .

El kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit es una prueba cualitativa. La prueba no sirve para realizar mediciones cuantitativas del porcentaje de mutación.

Se desconoce el rendimiento del kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit si se introduce contaminación microbiana durante los procedimientos del ensayo.

El rendimiento del kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit podría verse afectado por la presencia de citarabina, decitabina, triglicéridos, etopósido, clorhidrato de idarrubicina, clorhidrato de daunorrubicina o azacitidina en las muestras de ensayo.

13. Características del rendimiento

13.1. Rendimiento analítico

13.1.1. Límite del blanco

El límite de blanco (Limit of Blank, LoB) se define en la directriz EP17-A2 del CLSI como «el resultado de medición más elevado que es probable observar (con una probabilidad establecida) en una muestra de blanco». Para el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, este es el punto de datos que corresponde al percentil 95 superior en muestras en blanco (tipo natural, es decir, negativas para la mutación R132).

El LoB se ha determinado midiendo los niveles de señal de fondo para cada uno de los cinco ensayos de mutación de IDH1 del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, donde la señal de fondo se define como la amplificación inespecífica de bajo nivel de un molde de ADN. Para el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, esto hace referencia a la unión inespecífica de una sonda mutada al ADN de tipo natural.

Tabla 9. Resumen de resultados del LoB

Prueba IDH1	LoB (valor Ct)
R132H	Sin amplificación
R132C	Sin amplificación
R132S	Sin amplificación
R132G	Sin amplificación
R132L	Sin amplificación

Sobre la base de este análisis, el LoB del ensayo se ha determinado como la ausencia de valor de Ct.

13.1.2. Límite de detección

El límite de detección (LoD) se define como la frecuencia alélica más baja de la mutación IDH1 R132 (en un fondo de ADN de tipo natural) que es posible detectar el 95 % de las veces. El ADN genómico se extrajo de muestras de sangre completa (SC) y AMO con ADN de la línea celular mutante R132 añadido, y se diluyó en ADN normalizado extraído de muestras clínicas de SC y AMO de tipo natural. El ADN genómico se diluyó en serie a niveles de % de MAF por encima, en el nivel de y por debajo del LoD estimado para cada ensayo.

Se analizaron al menos 60 réplicas de cada dilución de % de frecuencia alélica mutante (MAF) de la serie a un nivel bajo de entrada de ADN utilizando tres lotes de *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit. El LoD de cada ensayo se determinó mediante un modelo Probit (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de resultados del LoD

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

El LoD se verificó en todo el rango de validez de los lotes de *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

13.1.3. Valor de corte del ensayo

El valor de corte del ensayo es un valor de ΔC_t específico utilizado para determinar si una muestra se clasifica como positiva o negativa para una mutación IDH1 R132. Las muestras que generan valores de ΔC_t iguales o inferiores al valor de corte se clasifican como positivas para la mutación R132 (es decir, mutación R132 detectada) y los valores de ΔC_t generados por encima del valor de corte se clasifican como negativos para la mutación R132 (es decir,

ninguna mutación detectada). Las tasas de falsos negativos y falsos positivos de cada ensayo específico para la mutación IDH1 se utilizaron para determinar un valor de corte para cada ensayo de mutación, de modo que un resultado igual o inferior al valor de corte dará lugar a una clasificación de IDH1 Mutation Detected (Mutación IDH1 detectada). El valor de corte para cada ensayo dentro del kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit se muestra en Tabla 11.

Tabla 11. Resumen de los valores de corte del ensayo

Prueba IDH1	Valor de corte del ensayo (valor ΔCt)
R132H	14,75
R132C	14,75
R132S	14,75
R132G	14,75
R132L	14,75

13.1.4. Intervalo de entrada de ADN genómico

El nivel de entrada de ADN se define como la cantidad total de ADN amplificable en una muestra, según lo determinado por el valor Ct de la reacción de control. Para demostrar que el rendimiento de *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit es constante en todo el intervalo de trabajo de la reacción de control (CWR) (21,54–25,25 Ct), se analizó una dilución en serie de 7 niveles con distintos niveles de entrada de ADN (con los niveles más alto y más bajo fuera del CWR). Esto se realizó para el tipo silvestre y para cada una de las cinco mutaciones R132 (a 1,5× LoD), y tanto para SC como para AMO.

La evaluación se realizó utilizando tres lotes de *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit con seis réplicas analizadas por nivel de entrada de ADN (dos réplicas por lote de kit). Los datos se analizaron mediante análisis de regresión para determinar el intervalo lineal. Para que el ensayo se determine como lineal en todo el intervalo de entrada de ADN, no debe haber cambios en el ΔCt en todo el intervalo para las muestras positivas para la mutación (es decir,

ningún efecto lineal, cuadrático o cúbico estadísticamente significativo). En el caso de la muestra de tipo silvestre, para que el ensayo se determine como lineal en todo el intervalo de entrada de ADN, debe haber un efecto lineal estadísticamente significativo en el Ct de control con respecto al nivel de dilución y ningún efecto cuadrático o cúbico estadísticamente significativo.

Las estimaciones de los parámetros para las diluciones analizadas demostraron linealidad para todas las muestras. Se observó un rango lineal de ΔCt y de Ct de control en todo el rango de entrada de ADN analizado para el ensayo.

13.1.5. Exactitud de la medición

Precisión

La repetibilidad del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit se evaluó mediante el análisis de muestras artificiales en dos niveles de mutación (1x LoD y 2x LoD) con la entrada estándar de ADN de 5 ng/μL; asimismo, se analizaron muestras de tipo natural en los niveles de entrada de ADN estándar (5 ng/μL) y bajo (3,5 ng/μL) en un centro (ubicado en el Reino Unido). Las muestras se analizaron por triplicado con cuatro series por muestra a lo largo de varios días, con distintos operadores e instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, y utilizando tres lotes de *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit para generar un total mínimo de 106 réplicas por muestra (Tabla 12 y Tabla 13).

Tabla 12. Repetibilidad del ensayo para muestras de aspirado de médula ósea*

Mutación	Nivel	Proporción fraccional de resultados válidos	Resultados correctos (%)	Límite inferior bilateral IC del 95 %
Tipo nativo	3,5 ng/μL	108 / 108	100,00	96,64
	5 ng/μL	106 / 106	100,00	96,58

Tabla 12. Repetibilidad del ensayo para muestras de aspirado de médula ósea* (continuación)

Mutación	Nivel	Proporción fraccional de resultados válidos	Resultados correctos (%)	Límite inferior bilateral IC del 95 %
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

* Número de identificaciones correctas y límites de confianza bilaterales inferiores del 95 % para cada mutación de IDH1 a 1× y 2× el LoD, y muestras de tipo natural analizadas en un centro.

Tabla 13. Repetibilidad del ensayo para muestras de sangre completa*

Mutación	Nivel	Proporción fraccionaria de resultados válidos	Resultados correctos (%)	Límite inferior bilateral IC del 95 %
Tipo nativo	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

Mutación	Nivel	Proporción fraccionaria de resultados válidos	Resultados correctos (%)	Límite inferior bilateral IC del 95 %
R132S	1× LoD	97 / 108	89,8	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

* Número de identificaciones correctas y límites de confianza bilaterales inferiores del 95 % para cada mutación de IDH1 a 1× y 2× el LoD, y muestras de tipo natural analizadas en un centro.

13.1.6. Precisión intermedia

Se evaluó la precisión intralaboratorio (repetibilidad) del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit. La precisión de los valores ΔC_t (la diferencia en los valores C_t entre una reacción de mutación y la reacción de control) para las muestras de ensayo positivas y los valores C_t de control para las muestras de ensayo negativas se indican en Tabla 14.

Tabla 14. Precisión intermedia de ΔC_t y C_t de control*

Muestra tipo	Análisis variable	Diana mutación	Ensayo	N	Media	Precisión intermedia (DE)	
AMO	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	
	Ct de control	WT	RM1	106	23,67	0,0903	
			RM2	106	23,72	0,1277	
	SC	ΔCt	R132C	RM1	107	6,77	1,4127
			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	
Ct de control		WT	RM1	108	23,67	0,0890	
			RM2	108	23,76	0,1123	

* Media y desviación estándar (precisión intermedia) para el ΔC_t de cada ensayo de mutación para muestras con mutación positiva $2 \times LoD$, y para el C_t de control para muestras de tipo natural (WT) con una entrada de ADN de 5 ng/ μ L, incluyendo tanto los tipos de muestra AMO como SC.

13.1.7. Reproducibilidad

La reproducibilidad del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit se evaluó mediante el análisis de muestras artificiales en dos niveles de mutación (1× LoD y 2× LoD) con la entrada de ADN estándar de 5 ng/μL; asimismo, se analizaron muestras de tipo natural en los niveles de entrada de ADN estándar (5 ng/μL) y bajo (3,5 ng/μL) en tres centros (uno situado en el Reino Unido y dos situados en EE. UU.). Las muestras se analizaron por duplicado con seis series por muestra a lo largo de varios días, con instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM y diversos operadores, y utilizando tres lotes de *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit para generar un total de un mínimo de 178 réplicas por muestra (Tabla 15 y Tabla 16).

Tabla 15. Reproducibilidad del ensayo para muestras de aspirado de médula ósea*

Mutación	Nivel	Proporción fraccional de resultados válidos	Resultados correctos (%)	Límite inferior del IC del 95 % bilateral
Tipo nativo	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

* Número de resultados correctos y límites de confianza inferiores bilaterales del 95 % para cada mutación de IDH1 a 1× y 2× LoD, y muestras de tipo natural analizadas en tres centros.

Tabla 16. Reproducibilidad del ensayo para muestras de sangre total*

Mutación	Nivel	Proporción fraccional de resultados válidos	Resultados correctos (%)	Límite inferior del IC del 95 % bilateral
Tipo nativo	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

* Número de resultados correctos y límites de confianza inferiores bilaterales del 95 % para cada mutación de IDH1 a 1× y 2× LoD, y muestras de tipo natural analizadas en tres centros.

13.1.8. Intercambiabilidad de lotes

El objetivo de este estudio fue demostrar que, independientemente de los lotes del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit y del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (IDH1 Kit) que se utilicen, el estado de la determinación de mutaciones para todas las muestras, tanto en sangre periférica (SP) como en aspirado de médula ósea (AMO), es coherente para todas las dianas.

Para evaluar la intercambiabilidad de lotes de los kits, en este estudio se utilizaron cinco muestras con mutación (una para cada diana de mutación detectada por el kit IDH1) y una muestra de tipo natural (WT) por cada tipo de muestra (12 muestras en total). Se extrajeron cuatro réplicas de extracción para cada muestra utilizando tres lotes independientes del kit de extracción. La concentración de ADN de cada réplica se cuantificó y posteriormente se

normalizó a 5 ng/μL (si no estaba ya dentro de un rango de 1–6 ng/μL). A continuación, cada réplica se evaluó mediante PCR, con una réplica por mezcla de reacción, utilizando tres lotes independientes del kit IDH1.

Para verificar la intercambiabilidad de lotes, se requirió que en todas las combinaciones de los lotes de QIAamp DSP DNA Blood Mini e *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, se observara una tasa de resultados correctos >90 % para cada diana en cada tipo de muestra (SP y AMO).

Se observó que todas las dianas tenían una tasa de resultados correctos >90 %. A excepción de R132H en el tipo de muestra de SP, se obtuvo una tasa de resultados correctos del 100 % (36/36). El tipo de muestra de sangre periférica (PB) R132H arrojó una tasa de resultados correctos del 91,67 % (33/36). Esto cumplió el requisito de intercambiabilidad de lotes del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit y del kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

13.1.9. Contaminación cruzada y arrastre analítico

El objetivo de este estudio era evaluar la presencia de arrastre en el kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit cuando se analizan muestras con mutación IDH1 positiva junto a muestras con mutación IDH1 negativa (tipo natural). Este estudio examinó todo el sistema IDH1, desde la extracción hasta la amplificación por PCR, e investigó si se producía contaminación por arrastre entre muestras, extracciones y dentro de las series analíticas o entre ellas.

Este estudio se realizó con muestras con mutación positiva (ya sea R132C o R132L) y de tipo natural de SC o AMO. Se extrajeron dos conjuntos independientes de muestras siguiendo una matriz de extracción predefinida diseñada para introducir el riesgo de contaminación cruzada de las muestras.

La contaminación cruzada por extracción se analizó en seis extracciones y la contaminación cruzada por PCR se analizó en seis series de PCR, siguiendo una matriz de series diseñada para introducir el riesgo de contaminación cruzada de las muestras. Las series de extracción y PCR fueron preparadas consecutivamente por el mismo operador (un operador por conjunto

independiente de muestras) utilizando el mismo equipo, sin que se prepararan otras series utilizando este instrumento entre ellas y utilizándose instrumentos distintos para cada conjunto de muestras. Se utilizaron un lote de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit y un lote de *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit a lo largo de este estudio.

Se analizó un total de 144 réplicas de tipo silvestre, y ninguna réplica de tipo natural generó un resultado de detección de mutación R132C o R132L. Por lo tanto, esto demuestra la ausencia de contaminación cruzada de las muestras de tipo silvestre por las muestras positivas en mutación que comparten el mismo procedimiento de extracción de ADN y de preparación de la serie.

13.1.10. Manipulación del material de muestra

En este estudio se evaluó la variabilidad de la manipulación de las muestras durante el proceso de extracción de ADN con el QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Se analizaron muestras de sangre completa (SC) y de aspirado de médula ósea (AMO) en tres laboratorios independientes. Cada uno de los tres centros procesó cuatro extracciones por muestra (12 muestras: cinco muestras con mutación de IDH1 y una muestra de tipo silvestre, para ambos tipos de muestra), lo que dio como resultado un total de 144 extractos de ADNg individuales.

Todas las muestras se enmascararon antes de la extracción. Cada muestra se extrajo, cuantificó y normalizó en los centros respectivos, y después se analizó con el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit en QIAGEN Manchester.

En todas las muestras con mutación y de tipo natural (WT), la proporción de identificaciones correctas fue del 100 %, lo que respalda la reproducibilidad y repetibilidad del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit en la fase preanalítica de extracción de ADN.

13.1.1.1. Sustancias interferentes (especificidad analítica)

El estudio tuvo como objetivo evaluar el impacto de sustancias exógenas y endógenas en el rendimiento del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit. El estudio incluyó al menos nueve réplicas para cada tipo de muestra (sangre total y aspirado de médula ósea) y estado de mutación (tipo natural, R132H y R132G), en combinación con cada interferente.

Las sustancias exógenas presentes en el proceso de extracción de ADN se analizaron mediante su adición al eluido de ADNg tras la extracción y normalización del ADN. Las muestras analizadas con posibles interferentes exógenos se enriquecieron con concentraciones que representaban el nivel más alto posible de arrastre de la sustancia interferente en una muestra. Las sustancias exógenas analizadas incluyeron:

- EDTA-K2
- Tampón de lisis
- QIAGEN Protease
- Etanol
- Tampón AW1
- Tampón AW2

Se añadieron sustancias endógenas, incluidos productos farmacéuticos y sustancias biológicas naturales, a muestras de sangre completa o de aspirado de médula ósea antes de la extracción de ADN. Las concentraciones de ensayo se determinaron basándose en los valores $C_{\text{máx}}$ (el triple de la concentración de una sustancia esperada en la muestra del paciente) o en las recomendaciones de la norma CLSI EP07-ED3. Las sustancias endógenas analizadas incluyeron:

- Citarabina
- Decitabina

- Etopósido
- Clorhidrato de idarubicina
- Clorhidrato de daunorrubicina
- Azacitidina
- Fosfato de fludarabina
- Hemoglobina
- Bilirrubina no conjugada
- Colesterol
- Albúmina
- Triglicéridos

Se agruparon hasta cuatro sustancias exógenas o cuatro endógenas utilizando un único disolvente, y las muestras enriquecidas se compararon con una muestra de control solo con disolvente. En caso necesario, las sustancias individuales de un grupo que mostraron un efecto de interferencia se analizaron posteriormente por separado.

Se observó que la citarabina, la decitabina, el etopósido, el clorhidrato de idarubicina, el clorhidrato de daunorrubicina, la azacitidina y los triglicéridos reducían potencialmente las tasas de validez de las muestras en aquellas con baja cantidad de ADN de entrada, pero no daban lugar a resultados incorrectos.

El fosfato de fludarabina, la hemoglobina, la bilirrubina no conjugada, el colesterol, la albúmina y todas las sustancias exógenas analizadas cumplieron los criterios de aceptación, lo que demuestra que no tienen un impacto significativo en el rendimiento del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

13.2. Rendimiento clínico

13.2.1. Sensibilidad y especificidad diagnóstica

El kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (IDH1 Kit) se comparó con una prueba de referencia de secuenciación de nueva generación (NGS), el panel Archer VariantPlex Core Myeloid (validado por ICON), en pacientes con LMA recién diagnosticados (utilizando tanto muestras de AMO como de PB, Tabla 17). La sensibilidad diagnóstica global fue del 98,48 % (intervalo de confianza [IC] binomial [exacto] de Clopper-Pearson del 95 %: [91,84 %, 99,96 %]) y la especificidad diagnóstica fue del 100 % (IC del 95 %: [96,11 %, 100 %]) (Tabla 18).

Tabla 17. Kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR frente a la prueba de referencia (ICON NGS) para LMA recién diagnosticada: análisis de todas las mutaciones

Frecuencia		Ensayo de referencia		
		IDH1 Mutation Detected (Detección de mutación de IDH1)	No se ha detectado la mutación IDH1	Total
<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit	IDH1 Mutation Detected (Detección de mutación de IDH1)	65	0	65
	No se ha detectado la mutación IDH1	1	93	94
	Total	66	93	159

Tabla 18. Sensibilidad y especificidad diagnósticas para la LMA recién diagnosticada: análisis de todas las mutaciones

	Frecuencias	Rendimiento clínico	Limite inferior del IC del 95 % bilateral	Limite superior del IC del 95 % bilateral
Sensibilidad diagnóstica	65 / 66	98,48	91,84	99,96
Especificidad diagnóstica	93 / 93	100,00	96,11	100,00

El análisis del rendimiento clínico también se realizó por mutación, tal como se presenta en Tabla 19 y Tabla 20.

Tabla 19. *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit frente a la prueba de referencia (ICON NGS) para LMA de diagnóstico reciente: análisis por mutación

Frecuencia		Ensayo de referencia							Total
		Mutación no detectada	R132C	R132G	R132H	R132H y R132C	R132L	R132S	
<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit	Mutación no detectada	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
	R132Hy 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
	Total	93	40	5	16	1	1	3	159

Tabla 20. Sensibilidad y especificidad diagnósticas para la LMA de diagnóstico reciente: análisis por mutación

Mutación	Sensibilidad diagnóstica	IC del 95 % bilateral	Especificidad diagnóstica	IC del 95 % bilateral
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. Utilidad/eficacia clínica del kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit con el tratamiento con TIBSOVO en combinación con azacitidina en LMA de diagnóstico reciente

Se seleccionaron los sujetos examinados en el estudio clínico AG120-C-009 que disponían de resultados de CTA de Abbott RealTime IDH1 para evaluar la concordancia entre el ensayo de Abbott (CTA) y el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (CDx). En el análisis pùente se incluyó el número máximo de muestras sobrantes positivas para mutaciones IDH1 según el ensayo CTA y que cumplían los criterios de inclusión/exclusión del estudio.

A fecha de corte de los datos del 18 de marzo de 2021, se habían identificado 146 sujetos positivos para la mutación IDH1 (con el CTA), que fueron aleatorizados para recibir ivosidenib (TIBSOVO) + azacitidina (N = 72) o placebo + azacitidina (N = 74).

De este conjunto de análisis completo (FAS), se excluyeron sujetos por las siguientes razones:

- Retirada del ensayo: 12 sujetos, y falta de consentimiento para pruebas futuras: 8 sujetos
- Muestras recogidas en China: 12 sujetos, excluidos debido a restricciones de exportación
- No se dispone de muestras sobrantes: 2 sujetos

Tras estas exclusiones, quedaron 112 muestras disponibles para el estudio puente.

De estas 112 muestras, 111 fueron positivas para la mutación IDH1 con el CTA y formaron el conjunto puente positivo. Una muestra había sido aleatorizada sobre la base de una prueba local y era CTA negativa, por lo que sirvió como muestra puente negativa. Tenga en cuenta que dos muestras no eran evaluables y otras dos se analizaron fuera del flujo de trabajo, lo que dio como resultado un total de 107 muestras evaluables.

Además, se utilizó un subconjunto independiente de sujetos CTA negativos para generar el conjunto de muestras negativas. Se dispuso de un total de 148 muestras CTA negativas para su análisis con el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit con el fin de identificar a los pacientes aptos para el tratamiento con ivosidenib (TIBSOVO) más azacitidina. Además, para determinar la eficacia clínica utilizando el kit IDH1, como lo demuestra la mejora de la supervivencia libre de eventos (SLE) y otros resultados clínicos coherentes con el estudio clínico AG120-C-009.

El estudio puente fue un análisis retrospectivo no intervencionista que utilizó muestras sobrantes de aspirado de médula ósea (BMA) y sangre periférica (PB) de pacientes con LMA recién diagnosticada. Los objetivos principales del estudio puente fueron evaluar la concordancia entre el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit y el CTA de Abbott, y evaluar la capacidad del kit IDH1 para identificar a pacientes aptos para el tratamiento con ivosidenib (TIBSOVO) más azacitidina. Además, se determinó la eficacia clínica utilizando el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, según lo demuestra la mejora de la supervivencia libre de eventos (SLE) y otros resultados clínicos coherentes con el estudio clínico AG120-C-009.

La población del estudio fue representativa en cuanto a datos demográficos, características de la enfermedad y tipo de muestra. No se observaron desequilibrios significativos entre los sujetos evaluables y no evaluables mediante CDx.

13.4. Concordancia clínica

El estudio puente clínico demostró que el porcentaje de concordancia positiva (PPA) y el porcentaje de concordancia negativa (NPA) cumplieron el umbral de concordancia predefinido de $\geq 95\%$, lo que establece la concordancia entre el *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit y el CTA de Abbott.

Los resultados de concordancia fueron los siguientes:

- PPA: 95,33 % (102/107; IC del 95 %: 89,43–98,47)
- NPA: 99,31 % (144/145; IC del 95 %: 96,22–99,98)
- Porcentaje de concordancia global (OPA): 97,62 % (246/252; IC del 95 %: 94,89–99,12)

Tabla 21. Concordancia entre el kit IDH1 (CDx) y el CTA de Abbott con el CTA como método de referencia

Estado de mutación del CDx		Estado de mutación del CTA	
Frecuencia	Mutación detectada	Mutación no detectada	Total
Mutación detectada	102	1	103
Mutación no detectada	5	144	149
Total	107	145	252

13.5. Eficacia clínica

La eficacia clínica del *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit se evaluó mediante la valoración de los resultados del tratamiento en pacientes con LMA de diagnóstico reciente identificados como

positivos para la mutación IDH1 mediante el CDx. Estos resultados, incluida la supervivencia libre de eventos (SLE), se compararon con la eficacia clínica observada en el estudio AG120-C-009, en el que la selección de pacientes se realizó mediante el CTA Abbott RealTime IDH1.

Tabla 22 muestra la EFS para los dos grupos de tratamiento de AG120-C-009 basada en la eficacia clínica, y Tabla 23 para los dos grupos de tratamiento de AG120-C-009 basada en los resultados positivos de la CDx.

Tabla 22. Resultados de supervivencia libre de eventos de la eficacia del ensayo clínico (AG120-C-009)

	TIBSOVO + azacitidina (N = 72)	Placebo + azacitidina (N = 74)
Sujetos (%) con eventos	46 (63,9 %)	62 (83,8 %)
Tasa de SLE (%) (IC del 95 %)		
1 día	41,7 % (30,2 %, 52,7 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
3 meses	41,7 % (30,2 %, 52,7 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
6 meses	39,90 % (28,6 %, 51,0 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
9 meses	39,90 % (28,6 %, 51,0 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
12 meses	37,4 % (25,9 %, 48,9 %)	12,2 % (4,3 %, 24,4 %)
18 meses	33,3 % (20,9 %, 46,2 %)	6,1 % (0,7 %, 20,9 %)
24 meses	22,2 % (6,6 %, 43,4 %)	0,0 % (-, -) NE*
36 meses	0,0 % (-, -) NE	0,0 % (-, -) NE*
Cociente de riesgos (en relación con placebo + azacitidina) (estratificado)	0,33	
IC del 95 %	(0,16; 0,69)	
Valor p para HR = 1 (unilateral)	0,0011	

* NE = No evaluable.

Tabla 23. Resumen de la supervivencia libre de eventos global basada en los resultados de CDx para la población 1

	Tibsovo + azacitidina (N = 50)	Placebo + azacitidina (N = 52)
Sujetos (%) con eventos	32 (64 %)	46 (88,5 %)
Sujetos (%) sin eventos (censurados)	18 (36,0 %)	6 (11,5 %)
Tasa de SLE (%) (IC del 95 %)		
1 día	40,0 % (26,5 %, 53,1 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
3 meses	40,0 % (26,5 %, 53,1 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
6 meses	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
9 meses	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
12 meses	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	9,0 % (2,4 %; 21,1 %)
18 meses	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	9,0 % (2,4 %; 21,1 %)
24 meses	25,2 % (7,4 %; 48,2 %)	0,0 % (-, -) NE*
36 meses	0,0 % (-, -) NE	0,0 % (-, -) NE*
Cociente de riesgos instantáneos (Hazard Ratio) (en relación con placebo + azacitidina) (estratificado)	0,438	
IC del 95 %	(0,254; 0,757)	
Valor p para HR = 1 (unilateral)	0,0016	

* NE = No evaluable.

Cuando se comparó con la población de eficacia del ensayo clínico, se observó una distribución uniforme entre los grupos de tratamiento en los sujetos CDx+ y el porcentaje de eventos entre los grupos fue similar al compararlo con la eficacia del ensayo clínico. El hazard ratio (HR) para el ensayo clínico fue de 0,33 y estadísticamente significativo (0,0011) (Tabla 22); el HR para la eficacia de la población CDx+ fue de 0,438 y estadísticamente significativo (0,0016) (Tabla 23). Aunque el HR de CDx es superior a la eficacia del ensayo

clínico, sigue habiendo una mejora con respecto al placebo, ya que tanto el HR del CTA como el del CDx son <1 , lo que significa que el tratamiento es eficaz y ambos son estadísticamente significativos.

- La SSC y los criterios de valoración secundarios en los pacientes CDx positivos fueron coherentes con los resultados del ensayo clínico principal.

El *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit demostró una alta concordancia con el ensayo del estudio clínico e identificó eficazmente a los pacientes con LMA de nuevo diagnóstico aptos para recibir terapia dirigida.

13.6. Resumen de seguridad y rendimiento

Puede consultar el resumen de seguridad y rendimiento en el sitio web de la base de datos europea sobre productos sanitarios (European Database on Medical Devices, EUDAMED).

14. Referencias

1. Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., ... & Su, S. M. (2009). Las mutaciones de IDH1 asociadas al cáncer producen 2-hidroxiglutarato. *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. y 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 database. Disponible en: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

15. Guía para la resolución de problemas

Esta guía para la resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, consulte también la página de preguntas frecuentes de nuestro Centro de Asistencia Técnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del Servicio de Asistencia Técnica de QIAGEN estarán encantados de responder a cualquier pregunta que pueda tener sobre la información o los protocolos de este manual, o sobre las tecnologías de muestras y ensayos (para obtener información de contacto, visite www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Indicador «NO_CT_VALUE» (Sin valor CT) en el control positivo (PC)

- | | |
|---|---|
| a. La configuración de la PCR no es correcta | Compruebe el esquema de pipeteo y repita la PCR. |
| b. Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplían las instrucciones indicadas en la sección «Almacenamiento y manipulación de los reactivos». | Compruebe las condiciones de almacenamiento (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario. |

Indicador «UNEXPECTED_CT_VALUE» (Valor CT inesperado) en NTC

- | | |
|---|---|
| a. Se ha producido contaminación durante la preparación de la PCR | Asegúrese de que el área se haya descontaminado. Repita la PCR con reactivos nuevos. Si es posible, cierre los tubos de PCR inmediatamente después de añadir la muestra que se desea analizar. Compruebe periódicamente que el espacio de trabajo y los instrumentos estén desinfectados. |
|---|---|

Indicador «ABOVE_ACCEPTABLE_RANGE» (Por encima del intervalo aceptable) o «BELOW_ACCEPTABLE_RANGE» (Por debajo del intervalo aceptable) en el PC

- | | |
|---|---|
| a. Error durante la preparación de la PCR | Repita la PCR asegurándose de que el pipeteo sea preciso. |
|---|---|

Comentarios y sugerencias

Indicador «DNA_INPUT_TOO_HIGH» (Entrada de ADN demasiado alta) en el tubo de muestra

- a. La concentración de la muestra es demasiado elevada

Repita Cuantificación y normalización del ADN. Es necesario diluir las muestras con el agua suministrada con el kit (agua para la dilución [Dil.]).

Indicadores «ABOVE_ACCEPTABLE_RANGE» (Por encima del intervalo aceptable) o «BELOW_ACCEPTABLE_RANGE» (Por debajo del intervalo aceptable) en el tubo de muestra

- a. El ADN de molde inicial presente en la muestra no es suficiente

Repita Cuantificación y normalización del ADN. Es necesario diluir las muestras con el agua suministrada con el kit (agua para la dilución [Dil.]). Tras repetir la prueba, si el valor de Ct del control sigue siendo no válido, vuelva a extraer la muestra. Si el valor de Ct del control no es válido tras la reextracción y otras dos rondas de pruebas, se debe informar de que la muestra tiene un estado de mutación indeterminado.

16. Símbolos

En las instrucciones de uso o en el embalaje y en el etiquetado, pueden aparecer los siguientes símbolos:

Símbolo	Definición del símbolo
	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Número de referencia
	Número de lote
	Número de material (p. ej., etiquetado de componentes)
	Componentes
	Contiene
	Número
	Número mundial de artículo comercial
	Identificador único de dispositivo
Rn	«R» es la revisión de las Instrucciones de uso y «n» es el número de revisión

Símbolo

Definición del símbolo



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso



Mantener alejado de la luz solar



Advertencia/Precaución



Peligro para la salud



Entorno

17. Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y obtener más información, póngase en contacto con nuestro centro de asistencia técnica en support@qiagen.com.

18. Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit	Para 24 reacciones: mezcla de reacción 1 para IDH1, Mezcla de reacción 2 para IDH1, Control positivo para IDH1, ADN Taq polimerasa, Agua para NTC, Agua para la dilución de muestras	675223
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit: para la purificación de ADN genómico a partir de sangre total o aspirado de médula ósea		
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: 50 columnas QIAamp Mini Spin, QIAGEN Proteinase, tampones, tubos de recogida (2 mL)	61104
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra; instalación y formación no incluidas	9002032
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Bloque de aluminio para la preparación manual de la reacción con un solo pipeta multicanal en 72 tubos de 0,1 mL	9018901
72-Well Rotor	Para sujetar tubos y tapones en tiras, 0,1 mL, con volúmenes de reacción de 10–50 µl; requiere el anillo de bloqueo del rotor de 72 pocillos	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Para fijar tubos y tapones en tiras de 0,1 mL en el rotor de 72 pocillos	9018904
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 tiras de 4 tubos y tapones para 1000 reacciones	981103

Producto	Contenido	N.º de cat.
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapones para 10 000 reacciones de 10–50 µL	981 106

Para obtener información actualizada sobre licencias y sobre exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el documento de instrucciones de uso del kit de QIAGEN correspondiente. Las instrucciones de uso de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al Servicio de Asistencia Técnica de QIAGEN o a su distribuidor local.

19. Historial de revisiones del documento

Revisión	Descripción
R1, junio de 2026	Versión inicial

Acuerdo de licencia limitada para el kit *ipsogen*® IDH1 RGQ PCR

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto puede utilizarse únicamente conforme a los protocolos suministrados con el mismo y a estas instrucciones de uso y para su uso exclusivo con los componentes incluidos en el panel. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, estas instrucciones de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales los han proporcionado usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. Estos protocolos no han sido probados ni optimizados exhaustivamente por QIAGEN. QIAGEN no los garantiza ni garantiza que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este panel ni sus usos no infrinjan derechos de terceros.
3. Este panel y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a toda responsabilidad respecto a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del panel aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este panel y/o con sus componentes.

Para consultar los términos actualizados de la licencia, consulte www.qiagen.com.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, QIAcube®, Rotor-Gene®, QIAamp®, Rotor-Gene AssayManager®, HotStarTaq® (QIAGEN Group); TaqMan® (Roche Group), TIBSOVO® (Servier Pharmaceuticals LLC). No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley.

06/2026 HB-3744-001 © 2026 QIAGEN, todos los derechos reservados.

