

август 2016

Наръчник за *therascreen*[®] IDH1/2 PCR-settet



Версия 1

За детекция на 12 *IDH1* и *IDH2* мутации при глиоми

IVD

Предназначен за ин витро диагностична употреба
Да се използва с апарат Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Хилден, Германия

R4 **MAT**

1075247BG

Съдържание

Предназначение.....	4
Обобщение и обяснение	4
Принципи на процедурата	6
Предоставени материали.....	9
Съдържание на кита	9
Необходими, но непредоставени материали	11
Предупреждения и предпазни мерки	13
Информация за безопасност.....	13
Общи предпазни мерки.....	13
Съхранение и боравене с реактивите.....	15
Условия на доставка	15
Съхранение	15
Стабилност	15
Съхранение и боравене с пробите	16
Процедура	17
ДНК екстракция и подготовка	17
Протокол: Детекция на <i>IDH1/2</i> мутации	21
Процедура:	24
Интерпретация на резултатите.....	26
Водни контроли.....	26
Осъществяване на качествен контрол, използвайки C_T стойностите на контролите.....	26
Валидиране на количеството проба	29
Резултати за пробите.....	29

Отстраняване на проблеми	35
Качествен контрол	39
Ограничения	39
Характеристики на изпълнение	41
Празен лимит (LOB)	41
Лимит на детекция (LOD)	41
Ефект на количеството на ДНК.....	43
Повтаряемост и възпроизводимост	43
Съпоставка на методиките	46
Референции.....	49
Символи.....	51
Информация за поръчки.....	53

Предназначение

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit е ин витро диагностичен тест, базиран на PCR технология, предназначен за качествена детекция на 7 мутации в *IDH1* гена и на 5 мутации в *IDH2* гена и за директна идентификация на 3 основни мутации, при ДНК, екстрахирана от фиксирана с формалин, включена в парафиново блокче човешка мозъчна тъкан.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit е предназначен да се използва като помощно средство при класификацията на глиоми.

Обобщение и обяснение

Мутациите в гените за изоцитрат дехидрогеназа (*IDH*), *IDH1* и *IDH2*, са често срещани при глиоми на възрастни, класифицирани според World Health Organization (WHO) като клас II и III, и при WHO клас IV вторични глиобластоми (GBM). В допълнение към тяхното диагностично значение, наличието на *IDH1/2* мутации е свързано с позитивна прогноза при пациенти с глиома (1-13).

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit е анализ за детекция на 12 специфични *IDH1/2* мутации: 6 в кодон 132 на гена *IDH1*, 5 в хомоложния кодон 172 на гена *IDH2* и една в кодон 100 на *IDH1* (Таблица 1). Също така, китът директно идентифицира основните *IDH1* и *IDH2* мутации, водещи до *IDH1* R132H, *IDH1* R132C и *IDH2* R172K замени.

Таблица 1. IDH1 и IDH2 мутации, установени чрез theascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit

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

* COSMIC ID са взети от Каталога на соматични мутации при рак (*Catalog of Somatic Mutations in Cancer*) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Принципи на процедурата

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit включва реагенти за извършването на 9 отделни амплификационни реакции за детекция на 12 мутации (Таблица 1):

- 3 общи амплификационни реакции на кодоните 132 и 100 на гена IDH1 и на кодон 172 на гена IDH2.
- 3 мутационни амплификационни реакции на кодоните 132 и 100 на гена IDH1 и на кодон 172 на гена IDH2.
- 3 мутационно-специфични амплификационни реакции на мутациите IDH1 R132H, IDH1 R132C, и IDH2 R172K.

Общи реакционни смеси

Общите миксове от праймери и сонди (PPM-Total) използват праймери и сонди за амплификация както на мутантната, така и на дивия тип прицелна секвенция (Фигура 1).

Реакционни миксове за детекция на мутации

Мутационните миксове от праймери и сонди комбинират праймери и сонди, за амплификация както на мутантната, така и на дивия тип прицелна секвенция и олигонуклеотид блокиран в 3' края си с фосфатна група за предотвратяване на елонгацията (PCR-clamping), който е специфичен към дивия тип прицелна секвенция.

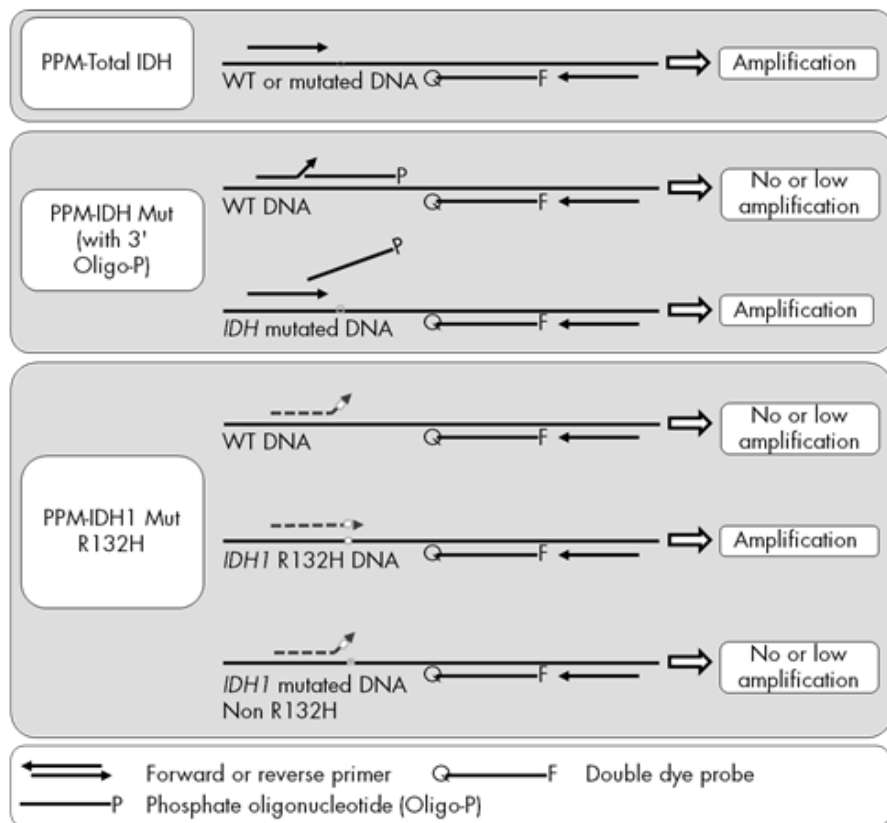
Когато PCR матрицата съдържа див тип последователност, 3'-фосфорилираният олигонуклеотид ще преобладава в PCR свързващото място, тъй като има по-висок афинитет към него. В този случай няма да има или ще се наблюдава слабо удължаване на веригата под действието на ДНК полимеразата, респективно ниско или никакво ниво на амплификация.

От друга страна, когато е представена мутантната секвенция, PCR праймерите ще преобладават над 3'-фосфат олигонуклеотидите, което означава, че амплификацията ще продължи.

Реакционен микс за идентификация на мутацията

Алел-специфична амплификация е постигната чрез ARMS (Amplification Refractory Mutation System), която използва способността на ДНК полимеразата да различава комплементарно сдвояване в 3' края на PCR праймера от некомплементарно.

При пълно съвпадение на PCR праймера, амплификацията се извършва с пълна ефективност. Когато 3' краят не е комплементарен, протича само слаба фонова амплификация (Фигура 1).



Фигура 1. Резултати получени със смесите от праймери и сонди на *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit. Принципът, който е показан за детекция на *IDH1* R132H е приложим и за *IDH1* R132C и *IDH2* R172K.

Предоставени материали

Съдържание на кита

<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Каталожен номер		873011
Брой реакции		20
Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> (Wild Type and Mutated)	PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Wild Type and Mutated)	PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Wild Type and Mutated)	PPM-Total <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R132</i>	PPM- <i>IDH1/R132</i> Mut 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH2/R172</i>	PPM- <i>IDH2/R172</i> Mut 25x	40 µl
Primers and Probe mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R100</i>	PPM- <i>IDH1/R100</i> Mut 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132H	PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x	40 µl

Таблицата продължава на следващата страница

Съдържание на кита (Продължение)

<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Каталожен номер		873011
Брой реакции		20
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132C	PPM-IDH1 Mut R132C 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH2</i> Mut R172K	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Wild Type Genomic DNA	IDH1/IDH2 WT Control	270 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Mutated Positive Control	IDH1/IDH2 Positive Control	270 µl
Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR	qPCR Master Mix 2x	5 x 900 µl
Nuclease-Free Water	Nuclease-Free Water	5 x 525 µl
<i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit Handbook</i> (English)		1

Необходими, но непредоставени материали

При работа с химикали, винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация, консултирайте се със съответните информационни листове за безопасност (SDSs), налични при доставчика на продукта.

Важно: Уверете се, че апаратите, използвани при тази процедура, са проверени и калибрирани съгласно препоръките на производителя.

Реагенти (ръчна екстракция на ДНК)

- Кит за изолиране на ДНК: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (кат.номер 56404)
- РНаза А (17,500 U) (кат.номер 19101)
- Ксилен или Histolemon™ (Carlo Erba, кат.номер 454911, www.carloerbareagents.com)
- Етанол (96–100%)
- 1x TE буфер, pH 8.0

Реагенти (автоматизирана ДНК екстракция)

- Кит за изолиране на ДНК: QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (кат.номер 937236)
- Буфер ATL (кат.номер 19076 or 939016)
- РНаза А (кат. номер 19101)
- Ксилен или Histolemon (Carlo Erba, кат.номер 454911, www.carloerbareagents.com)
- Етанол (96–100%)
- 1x TE буфер, pH 8.0

Консумативи

- Скалпели
- Свободни от нуклеази аерозолни PCR връхчета за пипети с хидрофобни
- Епруветки без нуклеази от 2.0 ml или 1.5 ml
- Епруветки и капачки от 0.1 ml за Rotor-Gene Q (кат.номер 981103 или 981106)
- Лед

Допълнителни консумативи за автоматизирана ДНК екстракция

- Sample Prep Cartridges, 8-ямкови (кат. номер 997002)
- 8-Rod Covers (кат. номер 997004)
- Filter-Tips, 200 μ l, Qsym SP (кат. номер 990332) и Filter-Tips, 1500 μ l, Qsym SP (кат. номер 997024)
- Elution Microtubes CL (кат. номер 19588)
- Микроепруветки от 2.0 ml, тип H (Sarstedt, кат. номер 72.693, www.sarstedt.com)

Оборудване

- Поставки за предметни стъкла и 2 съвместими с тях ванички за Ксилен/Histolemon и етанол.
- Микролитрови пипети, предназначени за PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Настолна центрофуга с ротор за реакционни епруветки от 0.5 ml/1.5 ml и микроплаки (със способност за достигане на 13,000–14,000 rpm)
- Настолен вортекс
- Апарат за real-time PCR: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM и свързаните с него специфични материали
- Rotor-Gene Q MDx софтуер, версия 2.1.0 или по-нова
- Биофотометър

- Термомиксер, орбитален инкубатор с нагряване, нагряващ блок или водна баня* със способност за инкубация при 56°C and 90°C

Допълнителна оборудване за автоматизирано пречистване

- QIAasymphony SP апарат
- QIAasymphony SP софтуер, версия 4.0 или по-нова

Предупреждения и предпазни мерки

За ин витро диагностична употреба

Информация за безопасност

При работа с химикали, винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация, моля консултирайте се със съответните листове за безопасност (SDSs). Те са на разположение онлайн в удобен и компактен PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, разгледате и отпечатате листовите за безопасност за всеки QIAGEN кит или компонент на кита.

За информация за безопасност относно пречистващият кит, вижте в съответния наръчник за употреба. За информация за безопасност по отношение на апаратурата, която се използва, вижте съответните ръководства за употреба.

Общи предпазни мерки

- Тестът се използва с фиксирани във формалин, включени в парафинови блокчета тъканни проби.

- Всички химикали и биологични материали са потенциално опасни. Образците и пробите са потенциално инфекциозни и трябва да бъдат третирани като биологично опасни материали.
- Изхвърлянето на отпадъците от пробите и анализа да се извършва в съответствие с местните процедури за безопасност.
- Реагентите в *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кита са оптимално разреждени. Не препоръчваме допълнително разреждане, тъй като това може да доведе до загуба на ефективност. Не използвайте реакционни обеми (реакционен микс + проба) по-малки от 25 µl.
- Всички реагенти, доставени в *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit са предназначени да бъдат използвани единствено с останалите реагенти от същия комплект. Не заменяйте никой от реагентите между различните *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR китове, тъй като това може да се отрази на работата на кита.
- Обърнете се към ръководството за употреба на Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM за допълнителни предупреждения, предпазни мерки и процедури.
- Промени в инкубирането и температурата могат да доведат до погрешни или противоречиви данни.
- Не използвайте компоненти с изтекъл срок на годност или неправилно съхранявани.
- Праймерите и сондите могат да претърпят промяна при излагане на светлина.
- Подхождайте с голямо внимание, за да предотвратите замърсяване на PCR миксовете със синтетичен контролен материал.
- Подхождайте с голямо внимание, за да предотвратите замърсяване с ДНази, които могат да доведат до разрушаване на матричната ДНК.
- Използвайте индивидуални, предназначени за целта пипети за направата на реакционните смеси и за добавянето на матриците.
- Подготовката и разпределянето на реакционните смеси трябва да се извършват на различно място от това, на което се добавя матрицата.

- Не отваряйте Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM докато не е приключил опитът.
- Не отаряйте ептуветките за Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM след приключване на опита.
- Предупрежденията трябва да се спазват за да се гарантира коректна обработка на пробите , с акцент върху предотвратяването на грешки при въвеждането на пробите, товаренето и пипетирането.

Съхранение и боравене с реактивите

Условия на доставка

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit се доставя върху сух лед. Ако някой от компонентите на *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit не е замразен при доставка, външната опаковка е била нарушена при транспортирането или пратката не съдържа опаковъчен лист, наръчник или някой от реагентите, моля свържете се с отдела за техническа поддръжка на QIAGEN (Technical Service Departments) или с местния дистрибутор (вижте задната корица или посетете www.qiagen.com).

Съхранение

Веднага след получаване, *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR китът трябва да се съхранява при -15 до -30°C във фризер с постоянна температура и да не се излага на светлина.

Стабилност

Когато е съхраняван при посочените в ръководството условия, *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR китът е годен за употреба до изтичане на срока на годност, посочен върху опаковката.

След като веднъж е отворен, може да бъде съхраняван в оригиналната си опаковка при -15 до -30°C до посочения срок на годност. Избягвайте многократното замразяване и размразяване. Допускат се най-много 5 цикъла на замразяване/размразяване.

Съхранение и боравене с пробите

therascreen IDH1/2 RGQ PCR китът се използва с ДНК проби, изолирани от мозъчни тумори, фиксирани във формалин и включени в парафинови блокчета (FFPE). Всички тъканни проби трябва да се третират като опасен материал.

- Тъканните проби трябва да са фиксирани с 4-10% неутрален буфериран формалин (NBF).
- От парафиновото блокче трябва да се отрежат $10\ \mu\text{m}$ последователни срези, които да се прикрепят върху предметните стъкла.
- Обучен специалист (напр. патолог) трябва да направи оценка на туморното съдържание и област върху съседен срез, оцветен с Хематоксилин/Еозин. Използвайте последователни срези за ДНК екстракция.
- Само срези с повече от 40% туморно съдържание са подходящи за тестване.
- За срези, които съдържат по-малко от $50\ \text{mm}^2$ тъканна площ се препоръчва да се обработят по-голям брой срези с цел да се увеличи общата тъканна площ до поне $50\ \text{mm}^2$ ($100\ \text{mm}^2$ за автоматизирана екстракция с QIASymphony SP)
- Туморните проби, блокчетата, препаратите и пробите трябва са бъдат етикетирани, обработвани и съхранявани според местните процедури.
- Съхранявайте парафиновите блокчета и препаратите на стайна температура. Препаратите могат да се съхраняват по този начин до 4 седмици след екстракцията на ДНК за обработка с *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кита.
- След екстракция, геномната ДНК може да се съхранява до 1 седмица на $2-8^{\circ}\text{C}$ или 8 седмици на -15 to -25°C .

Процедура

ДНК екстракция и подготовка

Използвайте QIAamp DNA FFPE Tissue кит (кат. номер. 56404) или QIASymphony DSP DNA Mini кит (кат. номер 937236) за пречистване на геномната ДНК от парафинирани (FFPE) проби от мозъчни тумори.

Забележка: *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR китът е валидиран само в комбинация с QIAamp DNA FFPE Tissue Kit или QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Не използвайте други продукти за ДНК екстракция.

Употреба на QIAamp DNA FFPE Tissue Kit



Моля, прочетете внимателно следните модификации, които трябва да бъдат приложени към QIAamp протокола.

- Вижте “Изходни материали” в наръчника за QIAamp DNA FFPE Tissue и “Съхранение и боравене с пробите”, стр. **Fehler! Textmarke nicht definiert.** от този наръчник, за подготовка на пробите преди депарафиниране и ДНК екстракция.
- The QIAamp DNA FFPE Tissue китът трябва да се използва само ръчно.
- РНазното третиране, описано в наръчника за QIAamp DNA FFPE Tissue трябва да се извърши.
- Не използвайте QIAGEN Депарафиниращ разтвор. Използвайте само методът с ксилен/етанол за депарафиниране, описан по-долу в “Депарафиниране на препаратите при използване на QIAamp DNA FFPE Tissue кита”. Ксиленът може да бъде заместен с Histolemon.
- Обработката с Протеиназа К трябва да продължи 1 час.

- Пробите трябва да се елуират двукратно в 30 µl от елиурация буфер (Буфер ATE) от QIAamp DNA FFPE Tissue кита.

Депарафиниране на препаратите при използване на QIAamp DNA FFPE Tissue кита

1. Поставете предметните стъкла в съответния статив.
2. Поставете във ваничка, съдържаща ксилен или Histolemon за 2 минути. Разклатете напред назад с 2-3 движения.
3. Поставете статива във втора ваничка, съдържаща етанол (96-100%) за 2 минути. Разклатете напред назад с 2-3 движения.
4. Изсушете препаратите на 15–37°C. Това ще отнеме няколко минути.
5. Сложете етикети на микроцентрифужни епруветки от 1,5 мл за всяка проба и добавете по 180 µl буфер ATL (от QIAamp DNA FFPE Tissue кита) във всяка от тях.
6. Поставете по няколко капки от буфер ATL върху тъканта на предметното стъкло (достатъчно за да покриете повърхността).
7. Острижете тъканта от предметното стъкло и я поставете в съответната микроцентрифужна епруветка.
8. Добавете по 20 µl протеиназа K (от QIAamp DNA FFPE Tissue кита) във всяка епруветка и вортексирайте.
9. Инкубирайте при 56°C за 1 час.

Продължете с инкубацията при 90°C от QIAamp DNA FFPE Tissue протокола (стъпка 12 в наръчника на *QIAamp DNA FFPE Tissue* кита, Юни 2012, стр.13).

Употреба на QIASymphony DSP DNA Mini кита



Моля, прочетете внимателно следните модификации, които трябва да бъдат приложени към QIAasymphony SP протоколния лист: Tissue_LC_200_V7_DSP.

- Вижте “Съхранение и боравене с пробите”, стр. Съхранение и боравене с реактивите за подготовка на пробите преди депарафиниране и ДНК екстракция.
- РНазната стъпка, описана в наръчника на QIAamp DNA FFPE Tissue кита трябва да се извърши.
- Не използвайте QIAGEN Депарафиниращ разтвор. Използвайте само метода с ксилен/етанол за депарафиниране, описан по-долу в “Депарафиниране на препаратите при използване на QIAamp DNA FFPE Tissue кита”. Ксиленът може да бъде заместен с Histolemon.
- Обработката с Протеиназа К трябва да продължи 1 час.
- Изберете 50 µl елуационен обем на тактилния дисплей.

Депарафиниране на препаратите при използване на QIAasymphony DSP DNA Mini Kit

Извършете депарафинирането съгласно следните стъпки, които се различават от прокола за QIAasymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP

1. Поставете препаратите в съответния статив.
2. Поставете статива във ваничка, съдържаща ксилен или Histolemon за 2 минути. Разклатете с 2-3 движения напред назад.
3. Поставете статива във втора ваничка, съдържаща етанол (96-100%) за 2 минути. Разклатете с 2-3 движения напред и назад
4. Изсушете препаратите на 15–37°C. Това ще отнеме няколко минути.
5. Сложете етикети на микроцентрифужни епруветки от 1,5 ml за всяка проба и добавете по 220 µl буфер ATL във всяка от тях.
6. Поставете няколко капки от буфер ATL върху тъканта на предметното стъкло (достатъчно за да покрие повърхността).

7. Остържете тъканта от предметното стъкло и я поставете в съответната микроцентрофужна епруветка.
8. Добавете по 20 μl протеиназа K (от QIAamp DNA FFPE Tissue кита) във всяка епруветка и вортексирайте.
Продължете с инкубацията при 56°C от QIASymphony SP протоколен лист: Tissue_LC_200_V7_DSP. (стъпка 12 в протокола „Депарафиниране чрез ксилен” протокол, Април 2012). Инкубирайте при 56°C за 1 час.

Геномна ДНК

Съхранявайте геномната ДНК на 2–8°C до една седмица след екстракция или за 8 седмици на –15 to –25°C.

Количеството ДНК трябва да се определи чрез измерване на оптичната плътност (OD) на пробите при 260 nm.

Разредете ДНК до концентрация 5 ng/ μl в 1x Те буфер, pH 8.0

PCR реакцията е оптимизирана за проби, съдържащи 25 ng пречистена геномна ДНК.

Протокол: Детекция на IDH1/2 мутации

Важни етапи, преди започване на процедурата

- За да използвате theascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit оптимално, пробите трябва да бъдат групирани по 4. По-малки групи означават, че по-малко проби могат да се изследват с theascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- Препоръчваме тестването на всички проби на един път, както е показано на Таблица 2. Също така е препоръчително да следвате оформлението на блока и настройките на ротора, показани на Таблица 3 и Фигура 2.

Таблица 2 . Брой реакции за Rotor-Gene Q MDx апарати със 72- ямков ротор.

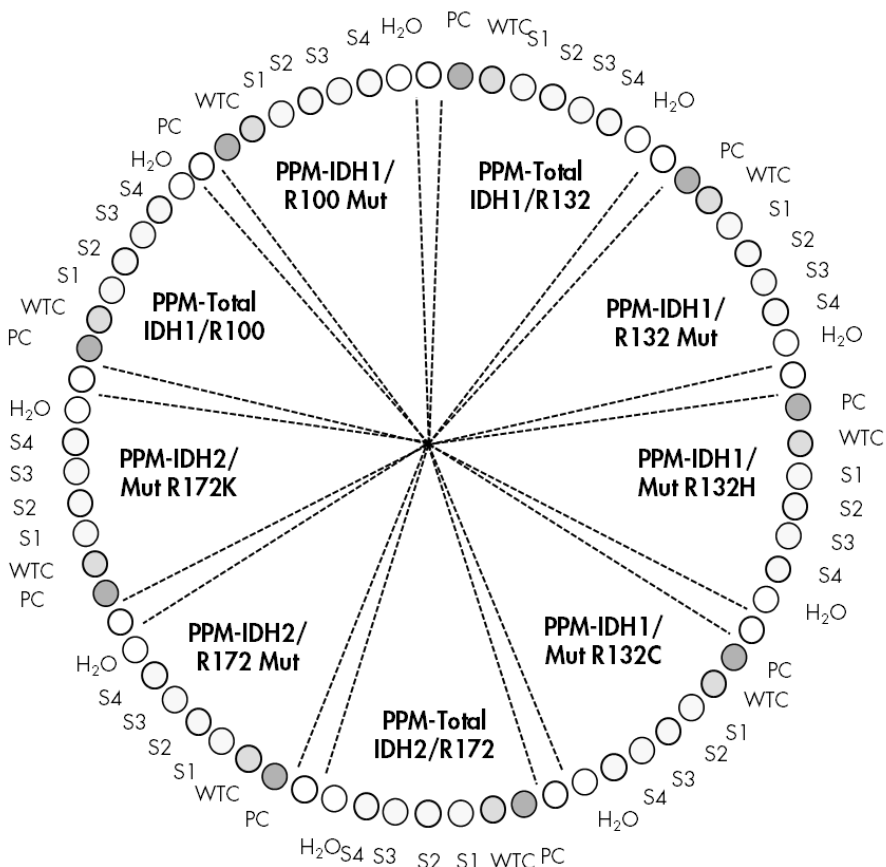
Проби	Реакции
n брой ДНК проби	n x 1 реакция
2 ДНК контроли	2 реакции: Положителна и водна контрола, по една на всеки PCR
Водна контрола	1 реакция

Таблица 3. Примерно зареждане на блок за експеримент с *therascreen* IDH1/2 RQG PCR

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

* PC: Положителна контрола.

[†] WTC: Див тип контрола



Фигура 2. Примерни настройки на ротора за експеримент с *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кита.

Забележка: Уверете се, че винаги поставяте проба на позиция 1 в ротора. В противен случай апаратът няма да се калибрира и данните получени при флуоресценцията ще бъдат некоректни.

Процедура:

1. Размразете всички необходими компоненти и ги поставете върху лед.
2. Подгответе PCR микса според броя на пробите, които да били обработени.

Всички концентрации са за краен обем на реакцията.

Таблица 4 описва схемата на пипетиране за подготовка на един реагентен микс, изчислен за достигане на краен реакционен обем от 25µl. Пре-микс може да се подготви за всеки PPM, според броя на реакциите. Допълнителният обем се включва за да компенсира грешките при пипетиране.

Таблица 4. Подготовка на PCR миксове

Компоненти	Пре-микс:*		
	1 реакция (µl)	7 + 1 реакции (µl)	Крайна концентрация
qPCR Master Mix, 2x	12.5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Вода без нуклеази	6.5	52	–
Проба или контрола [†] (да се добави в стъпка 4)	5	5 всяка	–
Краен обем	25	25 всяка	–

* Подгответе 9 пре-микса, по един с всеки PPM, предоставен в кита

[†] Положителна контрола, отрицателна контрола или водна контрола

3. Разпределете по 20 µl от пре-микс разтвора във всяка Rotor-Gene епруветка (Таблица 3).
4. Добавете по 5 µl от изходния материал (25 ng геномна ДНК или контрола) в съответстващата епруветка (общ обем 25 µl; Таблица 3).
5. Смесете снимателно чрез ресуспендиране.
6. Поставете епруветките в адаптера, предоставен заедно с апарата (Фирура 2).
Неизползваните позиции трябва да се запълнят с празни епруветки.
7. Поставете пълния адаптер в Rotor-Gene Q MDx апарата.
8. Задайте на Rotor-Gene Q MDx апарата програмата с температурни цикли, както е показано на Таблица 5.

Таблица 5. Температурен профил

Hold	Температура: 95°C Времетраене: 10 минути
Cycling	40 пъти 95°C за 15 секунди 60°C за 60 секунди с отчитане на FAM™ флуоресценция в зеления канал: Single

9. Натиснете **Gain Optimisation** в **New Run Wizard** диалогов прозорец за да се отвори **Auto-Gain Optimisation Setup**. Настройте обхвата за зеления канал от 2FI за **Min Reading** до 10FI за **Max Reading**.
10. Сложете отметка на Perform Optimisation Before 1st Acquisition и затворете **Auto-Gain Optimisation Setup** диалогов прозорец.
11. Стартирайте програмата.
12. След като Приключи програмата, извършете следното:
 - Изберете **Options** и **Crop Start Cycles**. Премахнете данните преди цикъл 10, за да се елиминират всички артефакти.
 - Изберете **Analysis** и **Cycling A. Green from 10**, посочено в доклада като **left threshold = 10.00**.
 - Изберете “**Dynamic Tube**” като метод за нормализация и **Slope Correct** за коригиране наклона на шума.
 - Настройте **Outlier Removal** на 0% (съответстващ на NTC прага).
 - Настройте **Reaction Efficiency Threshold** да бъде неактивен.
 - Настройте прага на 0.03.
 - Задайте линеен обхват на графиката.
 - Изберете **Digital Filter: Light**.

Интерпретация на резултатите

Водни контроли

Водната контрола (контрола без матрица) трябва да дава нулева стойност за C_T при всички миксове от праймери и сонди.

Ако стойността за C_T е положителна за водната контрола, този резултат е получен от кръстосано замърсяване. Вижте “Отстраняване на проблеми”, стр. 30, за да разрешите проблема.

Осъществяване на качествен контрол, използвайки C_T стойностите на контролите.

IDH1/2 див тип контролата (WTC) и мутантната *IDH1/2* положителна контрола дават възможност ексериментът да бъде окачествен.

За всяка контрола се изчисляват стойностите на ΔC_T , както следва:

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

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

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

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

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

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

Ако за някоя от пробите C_T има нулева стойност, използвайте 40 като стойност за да изчислите ΔC_T .

Контролите се класифицират като положителни за мутации, ако стойността на ΔC_T е по-малка или равна на респективната ΔC_T cutoff стойност, показана в Таблица 6.

Таблица 6. Cutoff стойности за всеки мутационен анализ

Мутационен анализ	Cutoff (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5.34
IDH2/R172 Mut	6.42
IDH1/R100 Mut	4.65
IDH1 Mut R132H	6.87
IDH1 Mut R132C	7.14
IDH2 Mut R172K	8.49

- IDH1/2 дивият тип контрола (WTC) трябва да бъде детектирана като отрицателна за всеки мутационен анализ (Таблица 7).
- Мутантната IDH1/2 положителна контрола трябва да бъде детектирана като позитивна за всеки мутационен анализ (Таблица 7).

Целият експеримент се счита за невалиден, ако не са изпълнени двете условия.

Таблица 7. Пример за валидиране на базата на контролите

	Вода (NTC)	IDH1/IDH2 див тип контрола	IDH1/IDH2 положителна контрола
C _T Total IDH1/R132	Неоткрита	25.45	23.95
C _T IDH1/R132 Mut	Неоткрита	34.32	25.76
ΔC _T IDH1/R132 Mut	Неоткрита	8.87	1.81
C _T Total IDH2/R172	Неоткрита	25.42	24.93
C _T IDH2/R172 Mut	Неоткрита	34.36	26.36
ΔC _T IDH2/R172 Mut	Неоткрита	8.94	1.43
C _T Total IDH1/R100	Неоткрита	26.30	24.69
C _T IDH1/R100 Mut	Неоткрита	33.04	26.39
ΔC _T IDH1/R100 Mut	Неоткрита	6.74	1.70
C _T IDH1 Mut R132H	Неоткрита	35.20	26.48
ΔC _T IDH1 Mut R132H	Неоткрита	9.75	2.53
C _T IDH1 Mut R132C	Неоткрита	37.16	27.07
ΔC _T IDH1 Mut R132C	Неоткрита	11.71	3.12
C _T IDH2 Mut R172K	Неоткрита	40.00	27.97
ΔC _T IDH2 Mut R172K	Неоткрита	14.58	3.04

Валидиране на количеството проба

Количеството проба трябва да бъде валидирано преди интерпретация.

Стойността за C_T , получена при проба за всеки PPM-Total (C_T Total IDH1/R132, C_T Total IDH2/R172, and C_T Total IDH1/R100) трябва да бъде по-ниска от 32.00. Стойности за C_T Total по-големи или равни за 32.00 се дължат на ниско качество на ДНК. Пробата трябва да се тества отново. Ако количеството на ДНК все още е недостъпно, извлечете още туморна тъкан, ако е налична (вижте “Отстраняване на проблемите”, стр. 30).

Резултати за пробите

Детекция на IDH1/2 мутации

For each sample, calculate the ΔC_T values obtained with each detection mutation assay (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut) as follows.

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

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

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

Ако за някоя от пробите C_T има нулева стойност, използвайте 40 като стойност, за да изчислите ΔC_T .

Пробите се класифицират като положителни за мутации, ако стойността на ΔC_T е по-малка или равна ΔC_T -cutoff стойността за съответния мутационен анализ, показана в Таблица 8.

Таблица 8. Cutoff стойности за всеки мутационен анализ

Мутационен анализ	Cutoff (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5.34
IDH2/R172 Mut	6.42
IDH1/R100 Mut	4.65

Идентификация на *IDH1/2* мутация

За всяка проба изчислете стойностите на ΔC_T , получени при всеки мутационен анализ (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K), както следва:

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

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

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

Ако за някоя от пробите ΔC_T има нулева стойност, използвайте 40 като стойност, за да изчислите ΔC_T .

Идентифицирана е мутация, ако стойността на ΔC_T е по-ниска или равна на ΔC_T cutoff стойността за съответния мутационен анализ, показана в Таблица 9. Примери за интерпретация на ΔC_T стойностите са показани в Таблица 10 и Таблица 11.

Таблица 9. Cutoff стойности за всеки мутационен анализ

Мутационен анализ	Cutoff (ΔC_T)
IDH1 Mut R132H	6.87
IDH1 Mut R132C	7.14
IDH2 Mut R172K	8.49

Таблица 10. Пример за детекция на *IDH1/2* мутация

Стойност	Проба 1	Проба 2
C_T Total IDH1/R132	26.39	26.32
C_T IDH1/R132 Mut	33.86	28.29
ΔC_T IDH1/R132 Mut	7.47	1.97
C_T Total IDH2/R172	26.79	25.79
C_T IDH2/R172 Mut	35.13	35.21
ΔC_T IDH2/R172 Mut	8.34	9.42
C_T Total IDH1/R100	27.20	27.37
C_T IDH1/R100 Mut	33.83	33.76
ΔC_T IDH1/R100 Mut	6.63	6.39
Детекция на мутации	Не е открита мутация	Открита е R132 мутация

Таблица 11. Пример за идентификация на *IDH1/2* мутация

Стойност	Проба 1	Проба 2
C _T Total <i>IDH1/R132</i>	26.39	26.32
C _T <i>IDH1 Mut R132H</i>	33.82	28.27
ΔC_T <i>IDH1 Mut R132H</i>	7.43	1.95
C _T Total <i>IDH1/R132</i>	26.39	26.32
C _T <i>IDH1 Mut R132C</i>	37.94	40.00
ΔC_T <i>IDH1 Mut R132C</i>	11.55	13.68
C _T Total <i>IDH2/R172</i>	26.79	25.79
C _T <i>IDH2 Mut R172K</i>	40.00	40.00
ΔC_T <i>IDH2 Mut R172K</i>	13.21	14.21
Детекция на мутации	Не е открита мутация	Открита е R132H мутация

Интерпретация на *IDH1/2* мутации

Процедурата, която се използва за посочване типа на *IDH1/2* мутацията при проби, позитивни за *IDH1/2* мутация, е показана в Таблица 12. Пример за интерпретация е показан в таблица 13.

Таблица 12. Наръчник за интерпретация

		Идентификация на мутации			
		<i>IDH1</i> Mut R132H detected	<i>IDH1</i> Mut R132C detected	<i>IDH2</i> Mut R172K detected	No mutation detected
Откриване на мутации	R132 открита мутация	R132H открита мутация	R132C открита мутация	–	R132 мутация, но нито R132H, нито R132C
	R172 открита мутация	–	–	R172K открита мутация	R172 мутация, но не R172K
	R100 открита мутация	–	–	–	R100
	Не е открита мутация	Ниско ниво мутация R132H открита (между 1% и 2%)*	Ниско ниво мутация R132C открита (между 1% и 4%)*	Ниско ниво мутация R172K открита (около 1%)*	Не е открита мутация

* Тези случаи могат да се появят рядко и всички проби и техническите критерии за одобрение трябва да бъдат проверени, особено съдържанието на туморни клетки. Ако всички критерии са изпълнени, пробата трябва да се тества отново.

Таблица 13. Пример за докладване и интерпретация на *IDH1/2* мутация

	Проба 1	Проба 2
Откриване на мутацията	Не е открита мутация	Открита мутация R132
Идентификация на мутацията	Не е открита мутация	Открита мутация за R132H
Интерпретация на резултата	Не е открита или идентифицирана мутация	R132H мутация

Забележка: Ако дадена проба има 2 или повече стойности за ΔC_T , които да са по-малки или равни на ΔC_T cutoff стойностите, тогава мутантният статус се дава на мутацията с най-голяма разлика между получената ΔC_T и cutoff стойността. Вижте примерите в Таблица 14.

Таблица 14. Пример за интерпретация в случай на множество положителни резултати

	Проба 3	Проба 4
ΔC_T <i>IDH1/R132 Mut</i>	1.24	5.24
ΔC_T cutoff <i>IDH1/R132 Mut</i>	5.34	5.34
$(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ <i>IDH1/R132 Mut</i>	4.10	0.10
ΔC_T <i>IDH2/R172 Mut</i>	5.32	5.95
ΔC_T cutoff <i>IDH2/R172 Mut</i>	6.42	6.42
$(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ <i>IDH2/R172 Mut</i>	1.10	0.47
Тълкуване на резултата	R132 мутантен	R172 мутантен

Отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да е полезно при отстраняване на проблеми, които може да възникнат. За повече информация посетете www.qiagen.com.

Коментари и предложения

Запушена колона по време на екстракция

- | | |
|----------------|---|
| Непълнен лизис | Повторете центрофугирането.
10. Остатъкът от лизата може да се прехвърли в нова колона.
Повторете екстракцията с по-малко FFPE тъкан. |
|----------------|---|

Недостатъчно количество ДНК в извлечения елуат

- | | |
|------------------------------------|--|
| Недостатъчно количество FFPE тъкан | Повторете екстракцията с по-голямо количество FFPE тъкан |
|------------------------------------|--|

IDH1/2 WT контролата не е детектирана

- | | |
|---|---|
| а) Грешки при пипетиране или пропуснати реагенти; инверсия на епруветки или плаки | Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.
Повторете PCR експеримента. |
| б) Неподходящо съхранение на компонентите от кита | Съхранявайте <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR кита при -15°C до -30°C и дръжте праймерите и сондите далеч от светлина. Вижте „Съхранение и боравете с реагентите“, стр.13.
Не надвишавайте максимума от 5 цикъла на замръзване-размръзване. |
| в) <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR китът е с изтекъл срок на годност | Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реагентите и ако е необходимо използвайте нов <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR кит. |

Коментари и предложения

IDH1/2 положителната контрола не е детектирана

- а) Грешки при пипетиране или пропуснати реагенти; инверсия на епруветки или плаки
- Проверете схемата за пипетиране и настройките на реакцията.
Повторете PCR експеримента.
- б) Неподходящо съхранение на компонентите от кита
- Съхранявайте *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кита при -15°C до -30°C и дръжте праймерите и сондите далеч от светина. Вижте „Съхранение и боравете с реагентите“, стр.13
- Не надвишавайте максимума от 5 цикъла на замръзване-размръзване.
- в) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit е с изтекъл срок на годност
- Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реагентите и ако е необходимо използвайте нов *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кит.

Няма сигнал, включително и при контролите

- а) Няма поставена реакционна епруветка на позиция 1 в Rotor-Gene Q MDx
- Уверете се, че винаги поставяте проба на позиция 1 в ротора. В противен случай апаратът няма да се калибрира и получените данни от флуоресценцията няма да бъдат коректни.
- б) Грешки при пипетиране или пропуснати реагенти; инверсия на епруветки или плаки
- Проверете схемата за пипетиране и настройките на реакцията.
Повторете PCR експеримента.
- в) Неподходящо съхранение на компонентите от кита
- Съхранявайте *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кита при -15°C до -30°C и дръжте праймерите и сондите далеч от светина. Вижте „Съхранение и боравете с реагентите“, стр.13.
- Не надвишавайте максимума от 5 цикъла за замръзване-размръзване.
- г) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR китът е с изтекъл срок на годност
- Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реагентите и ако е необходимо използвайте нов *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кит.

Коментари и предложения

годност

- д) Избран грешен канал на детекция
- Настройте канала на детекция на „Cycling Green“ или 530 nm/640 nm.
- е) Не е настроена програма за отчитане на данните
- Проверете PCR програмата. Вижте **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, стр. **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
- Настройте „acquisition mode“ на “Single” в края на всеки етап на удвояване от PCR програмата.

Вариации в интензитета на флуоресценцията

Грешки при пипетиране или пропуснати реагенти; инверсия на епруветки или плаки

Проверете схемата за пипетиране и настройките на реакцията.

Повторете PCR експеримента.

Интензитетът на флуоресценция е прекалено нисък

- а) Неподходящо съхранение на компонентите от кита
- Съхранявайте *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кита при -15°C до -30°C и дръжте праймерите и сондите далеч от светина. Вижте „Съхранение и боравете с реагентите“, стр.13.
- Не надвишавайте максимума от 5 цикъла на замръзване-размръзване.
- б) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR китът е с изтекъл срок на годност
- Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реагентите и ако е необходимо използвайте нов *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кит.
- в) Много ниско количество на таргетната ДНК
- Винаги проверявайте концентрацията на ДНК преди да започнете. Вижте „ДНК екстракция и подготовка“, стр.15.

Коментари и предложения

Отрицателната контрола (H₂O) дава положителен резултат

Кръстосано замърсяване, замърсяване на някой от реагентите, инструментална грешка, плакова или капилярна инверсия или деградация на пробата.

Заменете всички съмнителни реагенти или използвайте нов *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кит.

Винаги се отнасяйте към пробите, компонентите на кита и консумативите в съответствие с общоприетите практики за предотвратяване пренасянето на замърсяване.

Дръжте праймерите и сондите далеч от светлина.

Проверете флуоресцентните криви за фалшиво позитивни сигнали.

Проверете настройките на реакцията. Вижте „Протокол за детекция на IDH1/2 мутация“, стр.18.

Качествен контрол

В съответствие с ISO-сертифицираната система за управление на качеството на QIAGEN всяка партида на набора *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR е тествана за предварително определени спецификации, за да се гарантира постоянно качество на продукта. Сертификатите за анализ могат да бъдат получени при поискване на www.qiagen.com/support/.

Ограничения

Китът е предназначен за професионална употреба.

Продуктът трябва да се използва само от персонал, специално инструктуриран и обучен в молекулярно биологичните техники и запознат с тази технология.

Този кит трябва да се използва следвайки инструкциите, дадени в това ръководство, в комбинация с валидирани апарати, спометати в “Необходими, но непредоставени материали”, стр. Необходими, но непредоставени материали.

Трябва да се обърне внимание на срока на годност, отпечатан върху кутията и етикетите на всички компоненти от кита. Не използвайте реагенти с изтекъл срок на годност или неправилно съхранявани.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR китът е валидиран само проби от мозъчна тъкан, фиксирани в буферизиран формалин и включени в парафиново блокче.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit е валидиран само за употреба в комбинация с QIAamp DNA FFPE Tissue кита или с QIASymphony DSP DNA Mini кита.

Само апаратите Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (за PCR) и QIA Symphony SP (за подготовка на пробите) са валидирани.

Всяко използване на този продукт не по предназначение и/или промяна на някой от компонентите анулират отговорността на QIAGEN.

Потребителите са отговорни за валидиране работата на системата за всяка една процедура, използвана в техните лаборатории, която не се извършва от проучванията за оценка работата на кита извършвани от QIAGEN.

Тестът е предназначен за откриване на 7 мутации в кодони 132 и 100 на гена *IDH1* и 5 мутации в кодон 172 на гена *IDH2*. Проби, при които е получен резултат „Не е установена мутация“ е възможно да носят мутации в гените *IDH1/2*, които да не са детектирани по време на анализа.

Откриването на мутациите зависи от целостта на пробата, съдържанието на туморна тъкан и присъствието на амплифицируема ДНК в пробата.

Диагностичните резултати от изследването трябва да се интерпретират в контекста на всички значими клинични и лабораторни резултати.

Характеристики на изпълнение

Празен лимит (LOB)

Празният лимит (LOB) е определен (следвайки CLSI/NCCLS EP17-A препоръките; 14) при отрицателни проби (FFPE нормален мозък, 8 проби, 64 измервания/серия, 2 серии).

LOB резултатите са предствени в Таблица 15.

Таблица 15. Празен лимит (LOB)

Анализ	LOB	Краен LOB
R132 Mut	Валид. серия 1: 6.57 Валид. серия 2: 6.32	6.32
R132H Mut	Валид. серия 1: 7.91 Валид. серия 2: 8.22	7.91
R132C Mut	Валид. серия 1: 8.04 Валид. серия 2: 8.20	8.04
R172 Mut	Валид. серия 1: 7.74 Валид. серия 2: 7.59	7.59
R172K Mut	Валид. серия 1: 9.93 Валид. серия 2: 10.58	9.93
R100 Mut	Валид. серия 1: 6.52 Валид. серия 2: 5.19	5.17

Лимит на детекция (LOD)

Лимитът на детекция (LOD или аналитична чувствителност) е установен на базата на “подхода за профил на прецизността” описан в CLSI/NCCLS EP17-A препоръките

(14). Пет слабо позитивни проби (плазмидна ДНК накупана в див тип ДНК от глиоми) са използвани за всяка мутация (30 до 110 измервания на мутация и процент мутация).

LOD резултатите са представени в Таблица 16.

Таблица 16. Лимит на детекция (LOD)

Анализ	Мутации	LOD	Аналитичен праг	Чувствителност (%)
R132H Mut	R132H	6.87	6.87	0.78
R132C Mut	R132C	7.14	7.14	1.19
R172K Mut	R172K	8.49	8.49	0.61
R132 Mut	R132H	5.50	5.34	2.32
	R132C	5.34		4.35
	R132L	5.42		2.30
	R132G	5.61		2.23
	R132S	5.42		2.75
	R132V	5.56		2.24
R172 Mut	R172K	6.42	6.42	1.06
	R172G	6.58		3.00
	R172M	6.66		3.31
	R172S	6.42		14.93
	R172W	6.68		2.36

Анализ	Мутации	LOD	Аналитичен праг	Чувствителност (%)
R100 Mut	R100Q	4.65	4.65	3.45

Мутация е отчетена, ако ΔC_T е по-малка или равна на LOD стойността

Ефект на количеството на ДНК

ДНК е пречистена от 4 различни глиомни проби: 2 див тип IDH1/2 и 2 носещи IDH1 R132H (395G>A) мутация.

Три различни количества ДНК (включително препоръчаното за протокола) са тествани, за да се установи въздействието на количеството ДНК върху качествените резултати. Оказва се, че няма ефект върху качествените резултати. Наблюдават се, обаче, повече технически проблеми (CT Total QC failures) при въвеждане на по-малко ДНК от препоръчаното (<25 ng ДНК). Следователно, въвеждането на 25 ng ДНК при обем 5 μ l е препоръчително за провеждане на теста.

Повтаряемост и възпроизводимост

Проучването на точността е проведено при 4 различни проби (плазмидна ДНК накапана в див тип глиомна ДНК, съставляваща див тип, мутантна и прагова) изследвани 40 пъти в двукратно повторение (n = 80 измервания).

Стандартните отклонения (SD) и коефициентите на вариация (CV) са представени в Таблица 17.

Таблица 17. Резултати за прецизността

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

* R: Повтаряемост.

† Run: Възпроизводимост между експериментите.

‡ Total: Обща прецизност (вкл. между инструментите, между операторите и между партидите).

Таблицата продължава на следващата страница

Таблица 17. Продължение

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

* R: Повтаряемост.

† Run: Възпроизводимост между експериментите.

‡ Total: Обща прецизност (вкл. между инструментите, между операторите и между партидите).

Таблицата продължава на следващата страница

Таблица 17. Резултати за прецизността

Анализ	Проба	Средно ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	$CV_{Total}(\%)^\ddagger$	Точни попадения
R172 Mut	WT	9.47	0.91	0.87	1.45	15	100% (66/66)
	5%	4.45	0.35	0.12	0.56	13	100% (76/76)
	10%	3.55	0.29	0.02	0.53	15	100% (76/76)
	30%	2.05	0.18	0.15	0.47	23	100% (76/76)

* R: Повтаряемост.

† Run: Възпроизводимост между експериментите.

‡ Total: Обща прецизност (вкл. между инструментите, между операторите и между партидите).

Съпоставка на методиките

Съпоставка с имунохистохимия (IHC) за детекция на *IDH1/R132H* мутация.

Проведено е изследване, което демонстрира съгласието между оценката на мутационния статус чрез *therascreen IDH1/2 RGQ PCR* кита и чрез IHC (Анти-човешко антитяло *IDH1R132H*, клон H09, DIANOVA).

Подбрани са общо 103 проби от пациенти с глиома, като най-старата от тях е на 10 години.

Всяка от пробите е преминала през качествен контрол за *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* и за IHC.

Резултатите демонстрират процент на позитивно съгласие (PPA) 100%, процент на негативно съгласие (NPA) 98%, и общ процент на съгласие (OA) 99% (Таблица 18).

Таблица 18. Анализ на съгласието между *therascreen* RGQ PCR кита и IXX метода

Измерване на съгласието	Честота (%)	95% доверителен интервал
PPA	45/45 (100%)	[92;100]
NPA	57/58 (98%)	[91;100]
OA	102/103 (99%)	[96;100]

Съпоставка с двупосочно секвениране

Проведено е изследване, което демонстрира съгласието между оценката на мутационния статус чрез *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кита и чрез двупосочното секвениране.

Подбрани са общо 103 проби от пациенти с глиома, като най-старата от тях е на 10 години.

Всяка от пробите е преминала през качествен контрол за *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, като 101 проби дават резултат при двупосочното секвениране.

Резултатите демонстрират процент на позитивно съгласие (PPA) 100%, процент на негативно съгласие (NPA) 92%, и общ процент на съгласие (OA) 96% (Таблицы 19 и 20).

Таблица 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR кита в сравнение с двупосочно секвениране.

		Двупосочно секвениране по метода на Sanger				
		R132*	R132C	R132H	R172 [†]	WT
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR кит	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172 [†]	0	0	0	0	1
	WT	0	0	0	0	47

* R132 означава, че пробата е определена като положителна за R132 мутация, но нито за R132H, нито за R132C.

[†] R172 означава, че пробата е определена като положителна за R172 мутация, но не за R172K.

Таблица 20. Анализ на съгласието с двупосочното секвениране

Измерване на сходството	Честота (%)	95% доверителен интервал
PPA	50/50 (100%)	[93;100]
NPA	47/51 (92%)	[81;97]
OA	97/101 (96%)	[90;98]

Референции

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

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

СИМВОЛИ

В таблицата по-долу са описани символите, които може да са използвани върху етикетите или в настоящия документ.



<N>

Съдържа реагенти, достатъчни за <N> брой реакции



Да се използва до



Медицинско изделие за ин витро диагностика



Каталожен номер



Партиден номер



Номер на материала (т.е. етикет на компонента)



Компоненти (т.е. списък на това, което е включено)



Съдържание (съдържанието)



Брой (т.е. флакони, бутилки)

Rn

„R“ е за преработка на ръководството, а „n“ – номера на преработката



Световен търговски артикулен номер (Global Trade Item Number)



Температурни ограничения



Производител



Консултирайте се с ръководника при употреба



Внимание

Информация за поръчки

Информация за поръчки	Информация за поръчки	Кат. номер
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR кит (20)	За 20 реакции: 9 миска от праймери и сонди, WT контрола, позитивна контрола, мастър микс, вода без нуклеази	873011
Rotor-Gene Q MDx и принадлежности		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR апарат с HRM анализатор и 5 канала (green, yellow, orange, red, crimson) плюс HRM канал, лаптоп, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на части и труд, инсталация и обучение	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR апарат с HRM анализатор и 5 канала (green, yellow, orange, red, crimson) плюс HRM канал, лаптоп, софтуер, аксесоари: включва 1-годишна гаранция на части и труд, инсталацията и обучението не са включени	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Алуминиев блок за ръчно накапване с едноканална пипета в 72 x 0.1 ml епруветки	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 стрипа по 4 епруветки и капачки 1000 реакции	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 стрипа по 4 епруветки и капачки за 10,000 реакции	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — за пречистване на геномна ДНК от включена в парафиново блокче тъкан		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	За 50 ДНК препа: 50 QIAamp MinElute® колонки, протеиназа К,	56404

Информация за поръчки	Информация за поръчки	Кат. номер
	буфери, събирателни епруветки (2 ml)	
QIASymphony DSP DNA Mini Kit — за автоматизирано пречистване на ДНК от 1-96 проби		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	За 192 препа по 200 µl всеки: включва 2 касети с реагенти и ензими и аксесоари	937236
QIASymphony SP и принадлежности		
QIASymphony SP System	QIASymphony модул за пробоподготовка: включва инсталация и обучение, 1-годишна гаранция на части и труд	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony модул за пробоподготовка: включва 1-годишна гаранция на части и труд	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-ямкови касети за употреба с QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8 накрайника за употреба с QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Еднократни филтърни връхчета, в стативи; (8 x 128). За употреба с QIAcube и QIASymphony SP/AS апаратите	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Еднократни филтърни връхчета, в стативи; (8 x 128). За употреба с QIASymphony SP/AS апаратите	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Нестерилни полипропиленови епруветки (0.85 ml максимален капацитет под 0.7 ml полезен капацитет, 0.4 ml елуационен капацитет); 2304 в стативи по 96; включва стрипове капачки	19588

Информация за поръчки	Информация за поръчки	Кат. номер
Реагенти		
RNase A (17,500 U)	2.5 ml (100 mg/ml; 7000 ед./ml, разтвор)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml буфер за лизис на тъкани за 1000 препа	19076

За актуални лицензи и продуктово-специфични ограничения се обърнете към съответния наръчник или инструкции за употреба на QIAGEN. Наръчниците за китове на QIAGEN и инструкциите за употреба са достъпни на www.qiagen.com или могат да бъдат изискани от QIAGEN Technical Services или от вашия локален дистрибутор.

Този продукт е предназначен за ин витро диагностика. Продуктите на QIAGEN не могат да бъдат препродавани, модифицирани с цел препродажба или използвани за производствени цели без писменото съгласие на QIAGEN.

Информацията в този документ подлежи на промяна без предизвестие. QIAGEN не носи отговорност на грешки, които може да се съдържат в него. Счита се, че този документ е пълен и точен в момента на публикуването си. QIAGEN не носи отговорност за инциденти или щети, възникващи във връзка или по време на употребата на този документ.

QIAGEN гарантира за качеството на продуктите си и за способността им да посрещнат поставените към тях изисквания. Задълженията на QIAGEN и обезщетенията спрямо клиентите се ограничават до заетия на дадения продукт, ако той не е успял да изпълни целите си.

Попълването на този продукт позволява на клиента да го използва за изпълнение на диагностични услуги в сферата на ин витро диагностиката при хора. С настоящият документ не се издава никакъв друг патент или лиценз, освен правото за ползване на конкретния продукт.

Мутациите *IDH1/2* и тяхното използване са защитени с патентни права, включително Европейските приложения за патент EP2326735 и EP2546365, Американските приложения за патент US2011229479 and US2012202207 и чуждестранни партньори.

Попълването на този продукт не е съпроводено с никакво право за използването му в клинични изпитвания за лекарства с *IDH1/2* насоченост. QIAGEN разработва специални програми за тази цел. Моля, свържете се с нашия юридически отдел на idllicenses@qiagen.com.

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

Ограничено лицензно споразумение за **therascreen IDH1/2 RQG PCR Kit**

Употребата на този продукт е знак за съгласието на всеки купувач или ползвател със следните условия:

1. The product may be used solely in accordance with the protocols provided with the product and this handbook and for use with components contained in the kit only. QIAGEN grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this kit with any components not included within this kit except as described in the protocols provided with the product, this handbook, and additional protocols available at www.qiagen.com. Some of these additional protocols have been provided by QIAGEN users for QIAGEN users. These protocols have not been thoroughly tested or optimized by QIAGEN. QIAGEN neither guarantees them nor warrants that they do not infringe the rights of third-parties.
2. Освен изрично описаните лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този кит и/или неговата употреба няма да наруши правата на трети страни.
3. Китът и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват многократно, да се подновяват или да се препродават.
4. QIAGEN отрича всякакви други лицензи освен изрично посочените.
5. Купувачът и ползвателят на кита се съгласяват да не позволяват на трети лица по какъвто и да е начин да нарушат някоя от гореспоменатите забрани. QIAGEN може да наложи забраните на това ограничено споразумение във всеки съд и ще покрие всички разходи, свързани с разследване, съдебни такси и хонорари, необходими за налагането на ограниченото споразумение или на някоя от интелектуалните му права, свързани с кита и/или неговите компоненти.

За актуални лицензни условия посетете www.qiagen.com.

НВ-1566-004 1075247 154034217 08/2016

© 2013–2016 QIAGEN, всички права запазени.

