

August 2016

therascreen[®] IDH1 /2 RGQ PCR-kit håndbog



Version 1

Til påvisning af 12 *IDH1*- og *IDH2*-mutationer i gliom

IVD

Til in vitro-diagnostisk brug

Til brug med Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-instrumentet

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R4 **MAT**

1075247DA

Inhold

| | |
|--|----|
| Tilsigtet anvendelse | 4 |
| Opsummering og forklaring | 4 |
| Procedureprincip | 6 |
| Medfølgende materialer | 8 |
| Kit-indhold | 8 |
| Nødvendige materialer, som ikke medfølger | 10 |
| Advarsler og sikkerhedsforanstaltninger | 12 |
| Sikkerhedsinformationer | 12 |
| Generelle forholdsregler | 12 |
| Opbevaring og håndtering af reagenser | 13 |
| Forsendelsesbetingelser | 13 |
| Opbevaringsforhold | 14 |
| Stabilitet | 14 |
| Håndtering og opbevaring af prøver | 14 |
| Procedure | 15 |
| DNA-ekstrahering og klargøring | 15 |
| Protokol: Påvisning af <i>IDH1/2</i> -mutationer | 19 |
| Procedure | 22 |
| Fortolkning af resultater | 24 |
| Vandkontroller | 24 |
| Kvalitetskontrol med C_T -værdier for kontroller | 24 |
| Validering af prøveinput | 27 |

| | |
|---|----|
| Prøveresultater..... | 27 |
| Fejlfindingsvejledning | 33 |
| Kvalitetskontrol | 36 |
| Begrænsninger | 36 |
| Brugsegenskaber | 38 |
| Tomgrænse (LOB) | 38 |
| Påvisningsgrænse (LOD)..... | 38 |
| Effekt af DNA-input..... | 40 |
| Repeterbarhed og reproducerbarhed | 40 |
| Metodesammenligning | 43 |
| Referencer | 46 |
| Symboler | 48 |
| Bestillingsinformation..... | 50 |

Tilsigtet anvendelse

therascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet er en in vitro-diagnostisk test, som er baseret på PCR-teknologi og beregnet til kvalitativ påvisning af 7 mutationer af *IDH1*-genet og 5 mutationer af *IDH2*-genet samt til direkte identifikation af 3 store mutationer i DNA, som er ekstraheret fra formalinfikseret, paraffinindstøbt (FFPE) humant hjernevæv.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet er beregnet til brug som en hjælp til klassificering af gliomer.

Opsummering og forklaring

Mutationer i IDH-generne (isocitrat-dehydrogenase), *IDH1* og *IDH2*, findes hyppigt hos voksne for gliomer i klasse II og III iht. World Health Organization (WHO) samt sekundære klasse IV-glioblastomer (GBM) iht. WHO. Udover deres diagnostiske værdi associeres forekomsten af *IDH1/2*-mutationer med positiv prognostisk for gliompatienter (1-13).

therascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet er en analyse til påvisning af 12 specifikke *IDH1/2*-mutationer: 6 i codon 132 for *IDH1*-genet, 5 i homolog codon 172 for *IDH2* og én i codon 100 for *IDH1* (Tabel 1). Kittet kan også foretage en direkte identificering af store *IDH1*- og *IDH2*-mutationer, der medfører *IDH1* R132H-, *IDH1* R132C- og *IDH2* R172K-substitutioner.

Tabel 1. IDH1- og IDH2-mutationer, der påvises med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet

| Gen | Mutation | Basisændring | Kosmisk 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'er stammer fra *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Procedureprincip

therascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet indeholder reagenser til foretagelse af 9 separate forstærkningsreaktioner til påvisning af 12 mutationer (Tabel 1):

- 3 totale forstærkningsreaktioner af codon 132 og 100 for IDH1-genet og af codon 172 for IDH2-genet
- 3 mutationsforstærkningsreaktioner af codon 132 og 100 for IDH1-genet og af codon 172 for IDH2-genet
- 3 mutationsspecifikke forstærkningsreaktioner for IDH1 R132H-, IDH1 R132C- og IDH2 R172K-mutationer

Totale reaktionsblandinger

PPM-Total (totale primer- og probe-blandinger) bruger primere og prober til at forstærke både muterede og vildtype målsekvenser (Figur 1).

Reaktionsblandinger til mutationspåvisning

Primer- og probe-blandinger til mutationspåvisning kombinerer primere og prober for at forstærke både muterede og vildtype målsekvenser, plus en oligonukleotid, 3'-blok med tilføjelsen af en fosfatgruppe for at forhindre elongation (PCR-blokering), der er specifik for vildtype målsekvensen.

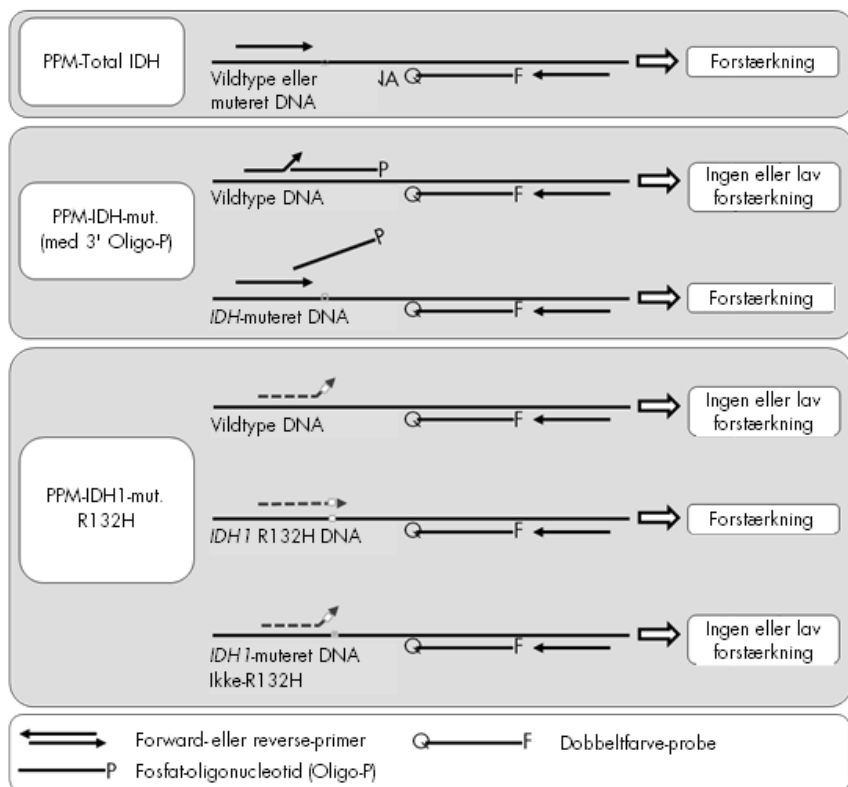
Når PCR-skabelonen indeholder vildtype sekvens, dominerer 3'-fosfat-oligonukleotiden over PCR-primerbindingen pga. højere affinitet. Der observeres ingen eller lav udvidelse af DNA polymerasen og ingen eller lav forstærkning.

Når der forekommer en muteret sekvens, dominerer PCR-primerbindingen over 3'-fosfat-oligonukleotidbindingen og forstærkningen fortsættes (Figur 1).

Reaktionsblandinger til mutationsidentifikation

Allele-specifik forstærkning opnås med ARMS (Amplification Refractory Mutation System), som anvender muligheden for, at Taq DNA-polymerase kan skelne mellem et match og et ikke-match i 3'-enden af en PCR-primer.

Når PCR-primeren er fuldt matchet, fortsætter forstærkningen med fuld effektivitet. Når 3'-basen ikke er matchet, forekommer der kun baggrundsforstærkning på et lavt niveau (Figur 1).



Figur 1. Resultater opnået med primer- og probe-blandinger i theascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet. De samme principper, der har vist sig at påvise IDH1 R132H, gælder for IDH1 R132C og IDH2 R172K.

Medfølgende materialer

Kit-indhold

| <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit | | (20) |
|--|-----------------------------------|---------------|
| Katalognr. | | 873011 |
| Antal reaktioner | | 20 |
| Primer- og probeblanding til påvisning af total <i>IDH1/R132</i> (vildtype og muteret) | PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x | 40 µl |
| Primer- og probeblanding til påvisning af total <i>IDH2/R172</i> (vildtype og muteret) | PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x | 40 µl |
| Primer- og probeblanding til påvisning af total <i>IDH1/R100</i> (vildtype og muteret) | PPM-Total <i>IDH1/R100</i> 25x | 40 µl |
| Primer- og probeblanding (inklusive Oligo-P) til påvisning af muteret <i>IDH1/R132</i> | PPM- <i>IDH1/R132</i> Mut 25x | 40 µl |
| Primer- og probeblanding (inklusive Oligo-P) til påvisning af muteret <i>IDH2/R172</i> | PPM- <i>IDH2/R172</i> Mut 25x | 40 µl |
| Primer- og probeblanding (inklusive Oligo-P) til påvisning af muteret <i>IDH1/R100</i> | PPM- <i>IDH1/R100</i> Mut 25x | 40 µl |
| Primer- og probeblanding til identifikation af <i>IDH1</i> -mut. R132H | PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x | 40 µl |

Tabellen fortsættes på næste side

Kit-indhold (fortsat)

| | | |
|--|----------------------------|---------------|
| <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit | | (20) |
| Katalognr. | | 873011 |
| Antal reaktioner | | 20 |
| Primer- og probeblanding til identifikation af <i>IDH1</i> -mut. R132C | PPM-IDH1 Mut R132C 25x | 40 µl |
| Primer- og probeblanding til identifikation af <i>IDH2</i> -mut. R172K | PPM-IDH2 Mut R172K 25x | 40 µl |
| Vildtype <i>IDH1/IDH2</i> -genomiske DNA | IDH1/IDH2 WT Control | 270 µl |
| <i>IDH1/IDH2</i> -muteret positiv kontrol | IDH1/IDH2 Positive Control | 270 µl |
| Blanding af <i>Taq</i> DNA-polymerase, dNTPs, MgCl ₂ og buffer til qPCR | qPCR Master Mix 2x | 5 x 900 µl |
| Nukleasefrit vand | Nuclease-Free Water | 5 x 525 µl |
| <i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit Handbook</i> (engelsk) | | 1 |

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Vigtigt: Kontrollér, at de instrumenter, der skal anvendes til denne procedure, er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

Reagenser (manuel DNA-ekstrahering)

- DNA-ekstraheringskit: QIAamp® DNA FFPE Tissue-kit (katalognr. 56404)
- RNase A (17.500 U) (katalognr. 19101)
- Xylen eller Histolemon™ (Carlo Erba, katalognr. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Ethanol (96-100 %)
- 1x TE-buffer, pH 8,0

Reagenser (automatisk DNA-ekstrahering)

- DNA-ekstraheringskit: QIASymphony® DSP DNA Mini-kit (katalognr. 937236)
- Buffer ATL (katalognr. 19076 eller 939016)
- RNase A (katalognr. 19101)
- Xylen eller Histolemon (Carlo Erba, katalognr. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Ethanol (96-100 %)
- 1x TE-buffer, pH 8,0

Forbrugsvarer

- Skalpeller
- Nukleasefrie, aerosol-resistente, sterile PCR-pipettespidser med hydrofobiske filtre

- 2,0 ml eller 1,5 ml nukleasefrie rør
- Båndrør og hætter, 0,1 ml, til Rotor-Gene Q (katalognr. 981103 eller 981106)
- Is

Flere forbrugsvarer til automatisk DNA-ekstrahering

- Sample Prep Cartridges, 8-well (cat.no.997002)
- 8-Rod Covers (cat.no.997004)
- Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (cat. no. 990332) and Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (cat. no. 997024)
- Elution Microtubes CL (cat.no. 19588)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (Sarstedt, cat. no. 72.693, www.sarstedt.com)

Udstyr

- Objektglasrack og 2 compatible objektglasbade til xylene/Histolemon og ethanol
- Mikroliter-pipetter dedikeret til PCR (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)
- Bordcentrifuge med rotor til 0,5 ml/1,5 ml reaktionsrør og mikroplader (der kan nå op på 13.000-14.000 o/min.)
- Bord-vortexer
- Realtids-PCR-instrument: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM og specifikt tilhørende materiale
- Rotor-Gene Q MDx-softwareversion 2.1.0 eller nyere
- Biofotometer
- Thermomixer, opvarmet orbital inkubator, varmeblok eller vandbad, der kan inkubere ved 56 °C og 90 °C

Yderligere udstyr til automatisk oprensning

- QIAasymphony SP-instrument
- QIAasymphony SP-softwareversion 4.0 eller nyere

Advarsler og sikkerhedsforanstaltninger

Til in vitro-diagnostisk brug

Sikkerhedsinformationer

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er). Disse er tilgængelige online i et PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN-kit og hver kitkomponenter.

Du kan finde sikkerhedsoplysninger til det anvendte oprensningskit i den relevante kit-håndbog. Du kan finde oplysninger om instrumenter i brugervejledningen til det relevante instrument.

Generelle forholdsregler

- Denne test er beregnet til brug med bufrede, formalinfikserede, paraffinindstøbte operations-resektionsvævsprøver.
- Alle kemikalier og alt biologisk materiale er potentielt farligt. Prøver er potentielt farlige og skal håndteres som biologisk farlige materialer.
- Prøve- og analyseaffald skal bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsprocedurer.
- Reagenserne til theascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet er fortyndet optimalt. Fortynd ikke reagenserne yderligere, da dette kan resultere i tab af ydelse. Brug ikke reaktionsvolumener (reaktionsblanding plus prøve) på under 25 µl.
- Alle reagenser, der leveres med theascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme kit. Erstat ikke nogen reagenser mellem theascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittene, da dette kan påvirke ydelsen.

- Se brugervejledningen til Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet for at få flere oplysninger om advarsler, forholdsregler og procedurer.
- Ændring af inkubering og temperaturer kan resultere i forkerte eller afvigende data.
- Forældede eller forkert opbevarede komponenter må ikke bruges.
- Primer- og probeblandingerne kan ændres, hvis de udsættes for lys.
- Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre forurening af blandingerne med de syntetiske materialer, der findes i det positive kontrolreagens.
- Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre DNase-forurening, der kan resultere i forringelse af DNA-skabelonen.
- Brug individuelle, velegnede pipetter til konfigurering af reaktionsblandinger og tilføjelse af skabeloner.
- Udfør klargøring og dispensering af reaktionsblandinger i et område, der er adskilt fra det, der bruges til tilføjelse af skabeloner.
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet må ikke åbnes, før kørslen er afsluttet.
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-rørene må ikke åbnes, når kørslen er afsluttet.
- Der skal udvises forsigtighed for at sikre korrekte test af prøver, hvad angår forkert prøveangivelse, fejl ved isætning og pipetteringsfejl.

Opbevaring og håndtering af reagenser

Forsendelsesbetingelser

therascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet sendes på tøris. Hvis nogle af komponenterne i *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet ikke er frosne ved modtagelse, hvis den ydre emballage har været åbnet under transporten, eller hvis forsendelsen ikke indeholder en følgeseddel, denne håndbog eller reagenserne, skal der rettes henvendelse til en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (besøg www.qiagen.com).

Opbevaringsforhold

therascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet skal straks efter modtagelse opbevares ved -15 til -30 °C i en fryser med konstant temperatur og beskyttes mod lys.

Stabilitet

Når det opbevares under de specifikke opbevaringsbetingelser, er *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet stabilt, indtil den anførte udløbsdato.

Når de er åbnet, kan reagenser opbevares i deres originale emballage ved -15 til -30 °C indtil udløbsdatoen, der er angivet på emballagen. Undgå gentagen optøning og indfrysning. Et reagens må højst indfryses og optøs 5 gange.

Håndtering og opbevaring af prøver

therascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet er beregnet til brug med DNA-prøver, der ekstraheres fra formalinfikseret, paraffinindstøbt (FFPE) tumurvæv fra operationsresektioner, der er indsamlet fra personer med hjerne cancer. Alle vævsprøver skal håndteres som potentielt farlige.

- Vævsprøver skal fikseres i 4-10 % neutralt bufret formalin (NBF).
- 10 µm serielle sektioner skal afskæres fra paraffinblokken og monteres på objektglassene.
- En uddannet person (f.eks. en patolog) skal vurdere tumorindholdet og området på en Hematoxylin- og Eosin-farvet (H&E) sektion. Brug serielle sektioner til DNA-ekstrahering.
- Kun sektioner med ≥ 40 % tumorindhold kan bruges til testen.
- For sektioner med et vævsområde < 50 mm², anbefales det at behandle et tilstrækkeligt antal sektioner til at øge det samlede vævsområde til mindst 50 mm² (100 mm² for automatisk ekstrahering på QIASymphony SP).

- Mærk, håndter og opbevar tumorprøver, blokke, objektglas og prøver, der er klar til ekstrahering på en kontrolleret måde i henhold til lokale procedurer.
- Opbevar FFPE-blokke og objektglas ved stuetemperatur. Objektglas kan opbevares ved stuetemperatur i op til 4 uger før DNA-ekstrahering til brug med theascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet.
- Efter ekstrahering kan genomiske DNA opbevares i op til 1 uge ved 2-8 °C eller til 8 uger ved -15 til -25 °C.

Procedure

DNA-ekstrahering og klargøring

Brug QIAamp DNA FFPE Tissue-kittet (katalognr. 56404) eller QIAasymphony DSP DNA Mini-kittet (katalognr. 937236) til oprensning af genomisk DNA fra prøver, der klargøres fra FFPE-hjernerneprøver.

Bemærk: *theascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet er kun valideret i kombination med QIAamp DNA FFPE Tissue-kittet eller QIAasymphony DSP DNA Mini-kittet. Der må ikke anvendes andre DNA-ekstraheringsprodukter.

Brug af QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kittet



Læs omhyggeligt om følgende ændringer, der skal implementeres i QIAamp-protokollen.

- Se "Starting material" (Startmateriale) i QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook (håndbog til QIAamp DNA FFPE Tissue) og "Håndtering og opbevaring af prøver", side 14 i denne håndbog for at få oplysninger om klargøring af prøver før deparaffinering og DNA-ekstrahering.

- QIAamp DNA FFPE Tissue-kittet må kun anvendes manuelt.
- Det RNase-trin, der er beskrevet i QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook (håndbog til QIAamp DNA FFPE Tissue), skal udføres.
- Brug ikke QIAGEN-deparaffineringsopløsningen. Brug kun xylene-/ethanol-metoden til deparaffineringsprocedure som beskrevet i "Deparaffineringsprocedure for objektglas ved brug af QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kittet" nedenfor. Xylen kan erstattes med Histolemon (xylen-erstatning).
- Udfør proteinase K-fordøjelse i 1 time.
- Prøverne skal elueres to gange i 30 µl elutionsbuffer (ATE-buffer) fra QIAamp DNA FFPE Tissue-kittet.

Deparaffineringsprocedure for objektglas ved brug af QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kittet

1. Placer objektglassene i et bestemt objektglasrack.
2. Sæt objektglasrack'et i et objektglasbad, der indeholder xylene eller Histolemon, i 2 minutter. Ryst med 2 eller 3 bevægelser tilbage og fremad.
3. Placer rack'et i et andet objektglasbad, der indeholder ethanol (96-100 %), i 2 minutter. Ryst med 2 eller 3 bevægelser tilbage og fremad.
4. Tør objektglassene ved 15-37 °C. Dette tager nogle få minutter.
5. Opmærk mikrocentrifugeringsrør med 1,5 ml for hver prøve, og fjør 180 µl buffer ATL (fra QIAamp DNA FFPE Tissue-kittet) til hvert rør.
6. Placer nogle få dråber buffer ATL på vævssektionerne på objektglassene (nok til at dække vævsoverfladen).
7. Skrab vævsområdet med en steril skalpel, og fjør det skræbete væv til det tilsvarende opmærkede mikrocentrifugerør.
8. Fjor 20 µl proteinase K (fra QIAamp DNA FFPE Tissue-kittet) til hvert rør, og bland med vortexing.
9. Inkuber ved 56 °C i 1 time.

Fortsæt med inkuberingsstrinnet ved 90 °C i QIAamp DNA FFPE Tissue-kitprotokollen (trin 12 i *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook* (håndbog til QIAamp DNA FFPE Tissue), juni 2012, side 13).

Brug af QIASymphony DNA Mini-kittet



Læs omhyggeligt om følgende ændringer, der skal implementeres i QIASymphony SP-protokolarket: Tissue_LC_200_V7_DSP.

- Se "Håndtering og opbevaring af prøver", side 14, for at få oplysninger om klargøring af prøver før deparaffinering og DNA-ekstrahering.
- Det RNase-trin, der er beskrevet i QIASymphony SP-protokolarket, skal udføres.
- Brug ikke QIAGEN-deparaffineringsopløsningen. Brug kun xylen-/ethanol-metoden til deparaffinering som beskrevet i "Deparaffineringsprocedure for objektglas ved brug af QIASymphony DSP DNA Mini-kittet" nedenfor. Xylen kan erstattes med Histolemon (xylen-erstatning).
- Udfør proteinase K-fordøjelse i 1 time.
- 50 µl elutionsvolumen skal vælges på berøringskærmen.

Deparaffineringsprocedure for objektglas ved brug af QIASymphony DSP DNA Mini-kittet

Udfør deparaffineringen iht. følgende trin, der afviger fra protokollen i QIASymphony SP-protokolarket: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Placer objektglassene i et bestemt objektglasrack.
2. Sæt objektglasrack'et i et objektglasbad, der indeholder xylen eller Histolemon, i 2 minutter. Ryst med 2 eller 3 bevægelser tilbage og fremad.
3. Placer rack'et i et andet objektglasbad, der indeholder ethanol (96-100 %), i 2 minutter. Ryst med 2 eller 3 bevægelser tilbage og fremad.
4. Tør objektglassene ved 15-37 °C. Dette tager nogle få minutter.

5. Opmærk mikrocentrifugeringsrør med 1,5 ml for hver prøve, og fjøj 220 µl buffer ATL til hvert rør.
6. Placer nogle få dråber buffer ATL på vævssektionerne på objektglassene (nok til at dække vævsøverfladen).
7. Skrab vævsområdet med en steril skalpel, og fjøj det skrabeede væv til det tilsvarende opmærkede mikrocentrifugerør.
8. Føj 20 µl proteinase K (fra QIAamp DNA FFPE Tissue-kittet) til hvert rør, og bland med vortexing.

Fortsæt med inkuberingstrin ved 56 °C i QIA Symphony SP-protokolarket: Protokollen Tissue_LC_200_V7_DSP (trin 12 i protokollen "Deparaffinization using xylene" (Deparaffineringsproces vha. xylene), april 2012). Inkuber ved 56 °C i 1 time.

Genomisk DNA

Opbevar genomisk DNA ved 2-8 °C i op til en uge efter ekstrahering eller til 8 uger ved -15 til -25 °C.

DNA-kvantiteten skal bestemmes ved måling af den optiske densitet (OD) for prøven ved 260 nm.

Fortynd DNA til en koncentration på 5 ng/µl i 1x TE buffer ved en pH-værdi på 8,0.

PCR-reaktionen er optimeret til prøver, der indeholder 25 ng oprenset genomisk DNA.

Protokol: Påvisning af *IDH1/2*-mutationer

Vigtige anvisninger før start

- For optimal brug af theascreen *IDH1/2* RGQ PCR-kittet skal prøverne inddeles i batch af 4. Mindre batchstørrelser betyder, at der kan testes færre prøver med theascreen *IDH1/2* RGQ PCR-kittet.
- Vi anbefaler at teste alle prøver én gang pr. PCR-kørsel, som angivet i Tabel 2 og med et isætningsbloklayout og en rotoropsætning som angivet i tabel 3 og figur 2.

Tabel 2. Antal reaktioner for Rotor-Gene Q MDx-instrumenter med rotor med 72-rør

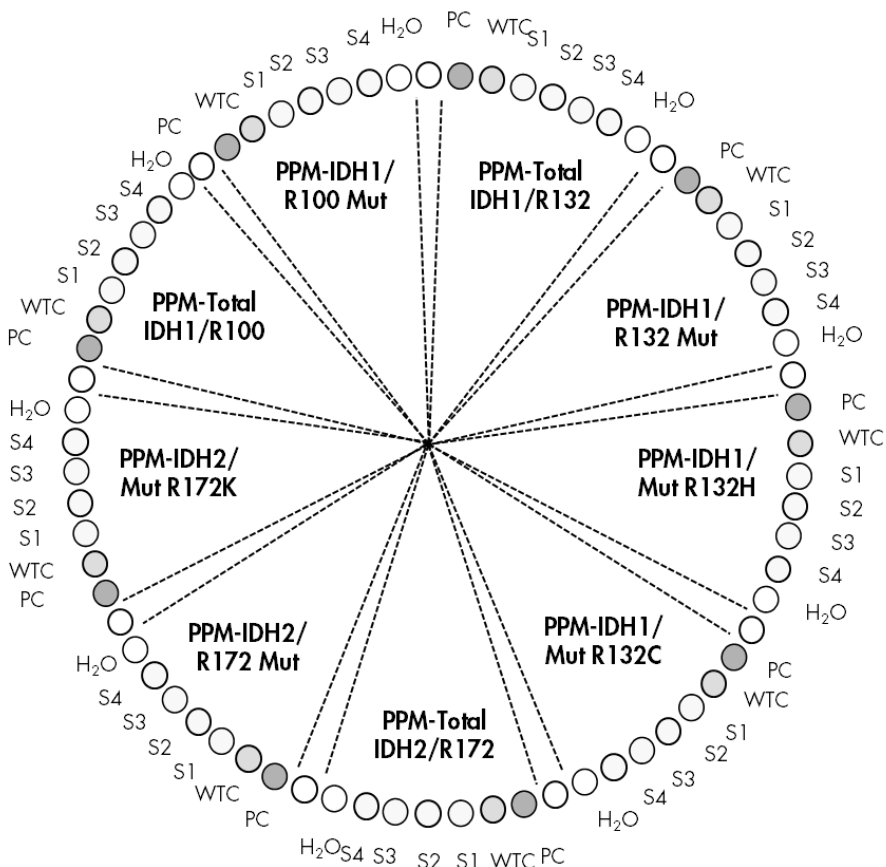
| Prøver | Reaktioner |
|------------------|---|
| n DNA-prøver | n x 1 reaktion |
| 2 DNA-kontroller | 2 reaktioner: Positive og vildtype kontroller, der hver testes én gang pr. PCR-kørsel |
| Vandkontrol | 1 reaktion |

Tabel 3. Foreslået isætningsblok til et eksperiment med theascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet

| Prøve | Total IDH1/ R132 | | IDH1 Mut R132H | | IDH1 Mut R132C | | Total IDH2/ R172 | | IDH2 Mut R172K | | Total IDH1/ R100 | | IDH1/ R100 Mut | |
|------------------|------------------|----|----------------|----|----------------|----|------------------|----|----------------|--|------------------|--|----------------|--|
| | 1 | 9 | 17 | 25 | 33 | 41 | 49 | 57 | 65 | | | | | |
| 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 | | | | | |
| Tomt rør | 8 | 16 | 24 | 32 | 40 | 48 | 56 | 64 | 72 | | | | | |

* PC: Positiv kontrol.

† WTC: Vildtype kontrol.



Figur 2. Foreslået rotorkonfiguration til et eksperiment med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet.

Bemærk: Sørg for altid at placere en prøve i position 1 på rotoren. Ellers vil instrumentet ikke foretage nogen kalibrering, og der vil blive hentet forkerte fluorescensdata.

Procedure

1. Optø alle nødvendige komponenter, og placer dem på is.
2. Klargør følgende PCR-blandinger ud fra, hvor mange prøver der behandles.

Alle koncentrationer er til den endelige volumen af reaktionen.

Tabel 4 beskriver pipetteringsplanen for klarlægningen af én reagensblanding, der er beregnet for at opnå en endelig reaktionsvolumen på 25 µl. Der kan klarlægges en forblanding for hver PPM ud fra antallet af reaktioner. Der er inkluderet ekstra volumener for at kompensere for pipetteringsfejl.

Tabel 4. Klargøring af PCR-blandinger

| Komponent | For-blanding:* | | Endelig koncentration |
|--|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 reaktion (µl) | 7 + 1 reaktioner (µl) | |
| qPCR-masterblanding, 2x | 12.5 | 100 | 1x |
| PPM, * 25x | 1 | 8 | 1x |
| Nukleasefrit vand | 6.5 | 52 | – |
| Prøve eller kontrol† (til tilføjelse i trin 4) | 5 | 5 hver | – |
| Volumen i alt | 25 | 25 hver | – |

* Klargør 9 for-blandinger, én for hver af PPM'erne i kittet.

† Positiv kontrol, negativ kontrol eller vandkontrol.

3. Dispenser 20 µl af for-blandingsopløsningen pr. Rotor-Gene-rør (Tabel 3).
4. Tilføj 5 µl af det materiale, der skal kvantificeres (25 ng prøve for genomisk DNA eller kontrol), i det tilsvarende rør (total volumen 25 µl; Tabel 3).
5. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.
6. Placer rørene i den adapter, der følger med instrumentet (Figur 2).
Ubrugt positioner skal fyldes op med tomme rør.
7. Sæt den fulde adapter i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.

8. Programmér Rotor-Gene Q MDx-instrumentet med det termiske cyklusprogram som angivet i Tabel 5.

Tabel 5. Temperaturprofil

| | |
|---------|--|
| Hold | Temperatur: 95 °C Tid: 10 min |
| Cycling | 40 gange 95 °C i 15 sek. 60 °C i 60 sek. med hentning af FAM™-fluorescens i kanalen Green (Grøn): Single (Enkel) |

9. Klik på **Gain Optimisation** (Optimering af forstærkning) i dialogboksen **New Run Wizard** (guiden Ny kørsel) for at åbne dialogboksen **Auto-Gain Optimisation Setup** (Konfiguration af auto-optimering af forstærkning). Angiv intervallet for grøn kanal fra 2FI for **Min Reading** (Min. aflæsning) til 10FI for **Max Reading** (Maks. aflæsning).
10. Markér boksen **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Udfør optimering inden første hentning), og luk derefter dialogboksen **Auto-Gain Optimisation Setup** (Konfiguration af auto-optimering af forstærkning).
11. Start det termiske cyklusprogram.
12. Når den termiske cyklus er afsluttet, skal du gøre følgende.
 - Vælg **Options** (Indstillinger) og **Crop Start Cycles** (Beskær startcyklusser). Fjern data før cyklus 10 for at kassere eventuelle artefakter.
 - Vælg **Analysis** (Analyse) og **Cycling A. Green from 10** (Cyklus A. Grøn fra 10), der er angivet på rapporten som "left threshold = 10.00" (venstre tærskelværdi = 10,00).
 - Vælg **Dynamic Tube** (Dynamisk rør) som normaliseringsmetode og **Slope Correct** (Hældningskorrigerer) for at korrigere støjhældningen.
 - Angiv **Outlier Removal** (Fjernelse af afvigelse) til 0 % (iht. NTC-tærskelværdien).
 - Angiv **Reaction Efficiency Threshold** (Tærskelværdi for reaktionseffektivitet) til deaktiveret.
 - Definer tærskelværdien til 0,03.

- Angiv grafen til lineær skala.
- Vælg **Digital Filter: Light** (Digitalt filter: lys).

Fortolkning af resultater

Vandkontroller

Vandkontroller (ingen skabelonskontroller) skal give C_T -nulværdier for alle primer- og probeblandinger.

Hvis der opnås en positiv C_T -værdi med en vandkontrol, skyldes dette krydskontaminering. Se "Fejlfindingsvejledning", side 33, for at finde en løsning.

Kvalitetskontrol med C_T -værdier for kontroller

Vildtype *IDH1/2*-kontrollen (WTC) og den muterede positive *IDH1/2*-kontrol (Mut-PC) giver mulighed for at kvalificere et eksperiment.

Beregn ΔC_T -værdierne for hver kontrol på følgende måde.

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

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

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

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

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

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

Hvis der opnås en C_T -værdi på 0 for en prøve, skal du bruge en C_T -værdi på 40 til at beregne ΔC_T -værdien.

Kontroller klassificeres som mutationspositive, hvis ΔC_T -værdierne er mindre end eller lig med de respektive ΔC_T -cutoff-værdier, der er angivet i Tabel 6.

Tabel 6. Cutoff-værdier for hver mutationsanalyse

| Mutationsanalyse | 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 |

- Vildtype IDH1/2-kontrollen skal påvises som mutationsnegativ for hver mutationsanalyse (Tabel 7).
- Den muterede IDH1/2-positive kontrol skal påvises som mutationspositiv for hver mutationsanalyse (Tabel 7).

Hele eksperimentet afvises, hvis ingen af betingelserne overholdes.

Tabel 7. Eksempel på kørselsvalidering på kontroller

| | Vand (NTC) | Vildtype IDH1/IDH2-kontrol | IDH1/IDH2-positiv kontrol |
|--------------------------------|-------------|-------------------------------|------------------------------|
| C _T Total IDH1/R132 | Ikke påvist | 25.45 | 23.95 |
| C _T IDH1/R132 Mut | Ikke påvist | 34.32 | 25.76 |
| ΔC _T IDH1/R132 Mut | Ikke påvist | 8.87 | 1.81 |
| C _T Total IDH2/R172 | Ikke påvist | 25.42 | 24.93 |
| C _T IDH2/R172 Mut | Ikke påvist | 34.36 | 26.36 |
| ΔC _T IDH2/R172 Mut | Ikke påvist | 8.94 | 1.43 |
| C _T Total IDH1/R100 | Ikke påvist | 26.30 | 24.69 |
| C _T IDH1/R100 Mut | Ikke påvist | 33.04 | 26.39 |
| ΔC _T IDH1/R100 Mut | Ikke påvist | 6.74 | 1.70 |
| C _T IDH1 Mut R132H | Ikke påvist | 35.20 | 26.48 |
| ΔC _T IDH1 Mut R132H | Ikke påvist | 9.75 | 2.53 |
| C _T IDH1 Mut R132C | Ikke påvist | 37.16 | 27.07 |
| ΔC _T IDH1 Mut R132C | Ikke påvist | 11.71 | 3.12 |
| C _T IDH2 Mut R172K | Ikke påvist | 40.00 | 27.97 |
| ΔC _T IDH2 Mut R172K | Ikke påvist | 14.58 | 3.04 |

Validering af prøveinput

Et prøveinput skal valideres før fortolkning.

Den C_T -værdi, der opnås for en prøve med hver PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ og $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$), skal være lavere end 32,00. $C_{T \text{ Total}}$ -værdier $\geq 32,00$ skyldes dårlig DNA-kvalitet. Prøven skal testes igen. Hvis kvantiteten af DNA'et stadig er utilstrækkelig, skal der ekstraheres mere væv, hvis det er tilgængeligt (se "Fejlfindingsvejledning", side 33).

Prøveresultater

IDH1/2-mutationspåvisning

For hver prøve beregnes de ΔC_T -værdier, der opnås med hver mutationspåvisningsanalyse (PPM-IDH1/R132-mut., PPM-IDH2/R172-mut., PPM-IDH1/R100-mut.) på følgende måde.

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

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

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

Hvis der opnås en C_T -værdi på 0 for en prøve, skal du bruge en C_T -værdi på 40 til at beregne ΔC_T -værdien.

Prøver klassificeres som mutationspositive, hvis ΔC_T -værdien er mindre end eller lig med ΔC_T -cutoff-værdien for den respektive mutationspåvisningsanalyse, der er angivet i Tabel 8.

Tabel 8. Cutoff-værdier for hver mutationspåvisningsanalyse

| Mutationsanalyse | Cutoff (ΔC_T) |
|------------------|-------------------------|
| IDH1/R132 Mut | 5.34 |
| IDH2/R172 Mut | 6.42 |
| IDH1/R100 Mut | 4.65 |

IDH1/2-mutationsidentifikation

For hver prøve beregnes de ΔC_T -værdier, der opnås med hver identifikationsmutationsanalyse (PPM-IDH1-mut. R132H, PPM-IDH1-mut. R132C, PPM-IDH2-mut. R172K), på følgende måde.

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

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

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

Hvis der opnås en C_T -værdi på 0 for en prøve, skal du bruge en C_T -værdi på 40 til at beregne ΔC_T -værdien.

Prøvemutationen identificeres, hvis ΔC_T -værdien er mindre end eller lig med ΔC_T -cutoff-værdien for den respektive mutationsidentifikationsanalyse, der er angivet i Tabel 9. Eksempler på ΔC_T -tolkning er vist i tabel 10 og tabel 11.

Tabel 9. Cutoff-værdier for hver mutationsidentifikationsanalyse

| Mutationsanalyse | Cutoff (ΔC_T) |
|------------------|-------------------------|
| IDH1 Mut R132H | 6.87 |
| IDH1 Mut R132C | 7.14 |

| Mutationsanalyse | Cutoff (ΔC_T) |
|-------------------------|---|
| IDH2 Mut R172K | 8.49 |

Table 10. Eksempel på IDH1/2-mutationspåvisning

| Værdi | Prøve 1 | Prøve 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 |
| Mutationspåvisning | Ingen mutation påvist | R132-mutation påvist |

Table 11. Examples of IDH1/2 mutation identification

| Værdi | Prøve 1 | Prøve 2 |
|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| C_T Total IDH1/R132 | 26.39 | 26.32 |
| C_T IDH1 Mut R132H | 33.82 | 28.27 |
| ΔC_T IDH1 Mut R132H | 7.43 | 1.95 |
| C_T Total IDH1/R132 | 26.39 | 26.32 |
| C_T IDH1 Mut R132C | 37.94 | 40.00 |
| ΔC_T IDH1 Mut R132C | 11.55 | 13.68 |
| C_T Total IDH2/R172 | 26.79 | 25.79 |
| C_T IDH2 Mut R172K | 40.00 | 40.00 |
| ΔC_T IDH2 Mut R172K | 13.21 | 14.21 |
| Mutationsidentifikation | Ingen mutation påvist | Mutation påvist for R132H |

Fortolkning af *IDH1/2*-mutationer

Den procedure, der bruges til at tildele *IDH1/2*-mutationstypen til prøver, som er positive for en *IDH1/2*-mutation, er vist i Tabel 12. Der vises et eksempel på fortolkning i tabel 13.

Tabel 12. Fortolkningsvejledning

| | | Mutationsidentifikation | | | |
|---------------------------|--------------------------------------|--|---|--|---|
| | | <i>IDH1</i> -mut. R132H påvist | <i>IDH1</i> -mut. R132C påvist | <i>IDH2</i> -mut. R172K påvist | Ingen mutation påvist |
| Mutationspåvisning | R132- mutation påvist | R132H- mutation påvist | R132C- mutation påvist | – | R132- mutation, men hverken R132H eller R132C |
| | R171- mutation påvist | – | – | R172K- mutation påvist | R172- mutation, men ikke R172K |
| | R100- mutation påvist | – | – | – | R100 |
| | Ingen mutation påvist | Lavt indhold af mutation R132H påvist (mellem 1 % og 2 %)* | Lavt indhold af mutation R132C påvist (mellem 1 % og 4%)* | Lavt indhold af mutation R172K påvist (ca 1 %)* | Ingen mutation påvist |

* Disse tilfælde forekommer nok sjældent, og alle prøver og tekniske godkendelseskriterier skal kontrolleres, særligt tumorcelleindhold. Hvis alle kriterier overholdes, skal prøve testes igen.

Tabel 13. Eksempel på IDH1/2-mutationsrapportering og -fortolkning

| | Prøve 1 | Prøve 2 |
|--------------------------------|---|---------------------------|
| Mutationspåvisning | Ingen mutation påvist | R132-mutation påvist |
| Mutationsidentifikation | Ingen mutation påvist | Mutation påvist for R132H |
| Fortolkning af resultat | Ingen mutation påvist eller identificeret | R132H muteret |

Bemærk: Hvis en prøve har 2 eller flere ΔC_T -værdier, der er mindre end eller lig med ΔC_T -cutoff-værdierne, tildeles mutantstatussen til mutationen med den største forskel mellem cutoff-værdien og den opnåede ΔC_T . Se eksempel i Tabel 14.

Tabel 14. Eksempel på fortolkning i tilfælde af flere positive resultater

| | Prøve 3 | Prøve 4 |
|--|--------------|--------------|
| ΔC_T IDH1/R132 Mut | 1.24 | 5.24 |
| ΔC_T cutoff IDH1/R132 Mut | 5.34 | 5.34 |
| $(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ IDH1/R132 Mut | 4.10 | 0.10 |
| ΔC_T IDH2/R172 Mut | 5.32 | 5.95 |
| ΔC_T cutoff IDH2/R172 Mut | 6.42 | 6.42 |
| $(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ IDH2/R172 Mut | 1.10 | 0.47 |
| Fortolkning af resultat | R132 muteret | R172 muteret |

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises til www.qiagen.com.

Kommentarer og forslag

Tilstoppet kolonne under DNA-ekstrahering

| | |
|-------------------|--|
| Ufuldstændig lyse | Gentag centrifugering. Den resterende lyse kan overføres til en ny kolonne. Gentag ekstraheringskørslen med mindre FFPE-væv. |
|-------------------|--|

Utilstrækkeligt DNA i ekstraheringsluatet

| | |
|---------------------------------|---|
| Utilstrækkeligt FFPE-vævsområde | Gentag ekstraheringskørslen med flere FFPE-vævssektioner. |
|---------------------------------|---|

Vildtype *IDH1/2*-kontrol ikke påvist

- | | |
|---|---|
| a) Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser; rør- eller brøndinversion | Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen. |
| b) Forkert opbevaring af kitkomponenter | Opbevar <i>therascreen IDH1/2</i> RGQ PCR-kittet ved -15 °C til -30 °C, og beskyt primer- og probeblandinger mod lys. Se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 13. Et reagens må højst indfryses og optøs 5 gange. |
| c) <i>therascreen IDH1/2</i> RGQ PCR-kittet er for gammelt | Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug evt. et nyt <i>therascreen IDH1/2</i> RGQ PCR-kit. |

IDH1/2-positiv kontrol ikke påvist

- | | |
|---|--|
| a) Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser; rør- eller brøndinversion | Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen. |
|---|--|

Kommentarer og forslag

- b) Forkert opbevaring af kitkomponenter
Opbevar *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet ved -15 °C til -30 °C, og beskyt primer- og probeblandinger mod lys. Se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 13.
Et reagens må højst indfryses og optøs 5 gange.
- c) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet er for gammelt
Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug evt. et nyt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kit.

Intet signal, herunder intet signal for kontroller

- a) Intet reaktionsrør i position 1 for Rotor-Gene Q MDx-instrumentet
Sørg for altid at placere en prøve i position 1 på rotoren. Ellers vil instrumentet ikke foretage nogen kalibrering, og der vil blive hentet forkerte fluorescensdata.
- b) Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser; rør- eller brøndinversion
Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen.
Gentag PCR-kørslen.
- c) Forkert opbevaring af kitkomponenter
Opbevar *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet ved -15 °C til -30 °C, og beskyt primer- og probeblandinger mod lys. Se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 13.
Et reagens må højst indfryses og optøs 5 gange.
- d) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet er for gammelt
Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug evt. et nyt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kit.
- e) Forkert påvisningskanal valgt
Angiv påvisningskanalen til Cycling Green (Cyklus grøn) eller 530 nm/640 nm.
- f) Intet datahentningsprogram
Kontrollér cyklusprogrammet. Se Tabel 5, side 23.
Vælg hentningstilstanden "Single" (Enkel) ved afslutningen af hvert afhærdningssegment i PCR-programmet.

Kommentarer og forslag

Fluorescensintensiteten varierer

Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser; rør- eller brøndinversion

Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen.
Gentag PCR-kørslen.

Fluorescensintensitet for lav

- a) Forkert opbevaring af kitkomponenter

Opbevar *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet ved -15 °C til -30 °C, og beskyt primer- og probeblandinger mod lys. Se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 13.

Et reagens må højst indfryses og optøs 5 gange.

- b) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet er for gammelt

Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug evt. et nyt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kit.

- c) Meget lav DNA-målmængde

Kontrollér altid DNA-koncentrationen før start. Se "DNA-ekstrahering og klargøring", side 15.

Negativ kontrol (H₂O) giver et positivt resultat

Krydskontaminering, reagenskontaminering, instrumentfejl, brønd- eller kapillærinversion eller probeforringelse

Udskift alle kritiske reagenser, eller brug et nyt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kit.

Håndter altid prøver, kitkomponenter og forbrugsvarer iht. almindeligt accepterede fremgangsmåder for at forhindre afsmittende kontaminering.

Beskyt primer- og probeblandinger mod lys.

Kontrollér for falsk-positive værdier på fluorescenskurver.

Kontrollér konfigurationen af reaktionen. Se "Protokol: Påvisning af *IDH1/2*-mutationer", side 19.

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet. Analysecertifikater er tilgængelig ved anmodning på www.qiagen.com/support.

Begrænsninger

Kittet er beregnet til professionel brug.

Produktet må kun bruges af personale med særlig kompetence og uddannelse inden for molekylærbiologiske teknikker og kendskab til denne teknologi.

Dette kit skal bruges iht. instruktionerne i denne vejledning sammen med et valideret instrument, som angivet i "Nødvendige materialer, som ikke medfølger", side 10.

Vær opmærksom på de udløbsdatoer, der er trykt på æsken og på etiketterne til samtlige komponenter. Brug ikke komponenter, der er for gamle.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet er kun valideret til bufret, formalinfikseret, paraffinindstøbt hjernevæv.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR-kittet er kun valideret til brug med QIAamp DNA FFPE Tissue-kittet eller med QIASymphony DSP DNA Mini-kittet.

Kun Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (til PCR) og QIASymphony SP (til prøveklargøring) er valideret.

Enhver brug til andre formål end de tiltænkte af dette produkt og/eller komponentændringer gør, at QIAGENS garanti bortfalder.

Det er brugerens ansvar at kontrollere systemets egnethed til eventuelle procedurer, der udføres i laboratoriet og ikke er omfattet af QIAGENS ydelsesundersøgelser.

Testen er udarbejdet til at påvise 7 mutationer i codon 132 og 100 for *IDH1*-genet og 5 mutationer i codon 172 for *IDH2*-genet. Prøver med resultater som "no mutation detected" (ingen mutation påvist) kan indeholde *IDH1*- eller *IDH2*-mutationer, der ikke påvises af analysen.

Påvisning af mutationer afhænger af prøvens integritet, tumorindholdet og mængden af amplificerbart DNA i prøven.

De diagnostiske resultater, der genereres med produktet, skal fortolkes inden for konteksten af alle relevante kliniske fund eller laboratoriefund.

Brugsegenskaber

Tomgrænse (LOB)

Tomgrænsen (LOB) blev bestemt (iht. CLSI/NCCLS EP17-A-retningslinjen; 14) på negative prøver (FFPE-normal hjerne, 8 prøver, 64 målinger/lot, 2 lot).

LOB-resultaterne er angivet i Tabel 15.

Tabel 15. Tomgrænse (LOB)

| Analyse | LOB | Endelig LOB |
|-----------|---|-------------|
| R132 Mut | Valideringslot 1: 6.57 Valideringslot 2: 6.32 | 6.32 |
| R132H Mut | Valideringslot 1: 7.91 Valideringslot 2: 8.22 | 7.91 |
| R132C Mut | Valideringslot 1: 8.04 Valideringslot 2: 8.20 | 8.04 |
| R172 Mut | Valideringslot 1: 7.74 Valideringslot 2: 7.59 | 7.59 |
| R172K Mut | Valideringslot 1: 9.93 Valideringslot 2: 10.58 | 9.93 |
| R100 Mut | Valideringslot 1: 6.52 Valideringslot 2: 5.19 | 5.17 |

Påvisningsgrænse (LOD)

Påvisningsgrænsen (LOD eller analytisk sensitivitet) blev bestemt ud fra den "precision profile approach" (præcisionsprofilmetode), der er beskrevet i CLSI/NCCLS EP17-A-retningslinjen

(14). Fem lave positive prøve (plasmid-DNA tilsat i vildtype gliom-DNA) blev brugt pr. mutation (30 til 110 målinger pr. mutationstype og mutationsprocent).

LOD-resultaterne er angivet i Tabel 16.

Tabel 16. Påvisningsgrænse (LOD)

| Analyse | Mutationer | LOD | Analyse-cutoff | Sensitivitet (%) |
|-----------|------------|------|----------------|------------------|
| 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 |

| Analyse | Mutationer | LOD | Analyse-cutoff | Sensitivitet (%) |
|----------|------------|------|----------------|------------------|
| R100 Mut | R100Q | 4.65 | 4.65 | 3.45 |

En mutation er påvist, hvis ΔC_T er mindre end eller lig med LOD.

Effekt af DNA-input

DNA blev ekstraheret fra 4 forskellige gliom-tumorprøver: 2 med vildtype *IDH1/2*- og 2 med *IDH1* R132H-mutationen (395G>A).

Tre forskellige DNA-mængder (herunder den anbefalede for protokollen) blev testet for at evaluere effekten af DNA-input på kvalitative resultater. Resultaterne viste, at DNA-input ikke havde nogen effekt på de kvalitative resultater. Der blev dog observeret flere tekniske fejl ($C_{T \text{ Total}}$ QC-fejl) for DNA-input under det anbefalede input (<25 ng DNA). Derfor anbefales et input på 25 ng DNA i en volumen på 5 μ l til kørsel af testen.

Repeterbarhed og reproducerbarhed

Præcisionsundersøgelsen blev udført på 4 forskellige prøver (plasmid-DNA tilsat i vildtype gliom-DNA til repræsentation af vildtype (WT), mutant og cutoff-prøve), der blev testet 40 gange i dobbelttest (n = 80 målinger).

Standardafvigelser (SD) og variationskoefficient (CV) er angivet i Tabel 17.

Tabel 17. Præcisionsresultater

| Analyse | Prøve | Middel-værdi ΔC_T | SD_R^* | $SD_{Kørsel}^\dagger$ | SD_{Total}^\ddagger | CV_{Total} (%) [‡] | Korrekte bestem-melses-forhold |
|--------------|-------|------------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 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: Repeterbarhed.

† Kørsel: Repeterbarhed mellem kørsler.

‡ Total: Total præcision (herunder mellem instrumenter, mellem operatører og mellem lot).

Tabellen fortsættes på næste side

Tabel 17. Præcisionsresultater (fortsat)

| Analyse | Prøve | Middel-værdi ΔC_T | SD_R^* | $SD_{Kørsel}^\dagger$ | SD_{Total}^\ddagger | CV_{Total} (%) [‡] | Korrekte bestem-melses-forhold |
|-------------|--------------|------------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| R100 Mut | WT | 7.21 | 0.41 | 0.27 | 0.52 | 7 | 100% (70/70) |
| | 5% | 3.68 | 0.27 | 0.16 | 0.33 | 9 | 100% (76/76) |
| | 10% | 2.93 | 0.24 | 0.15 | 0.32 | 11 | 100% (76/76) |
| | 30% | 1.56 | 0.25 | 0.07 | 0.26 | 17 | 100% (76/76) |
| R132 Mut | WT | 8.01 | 0.76 | 0.00 | 0.78 | 10 | 100% (152/152) |
| | R132H 5% | 4.29 | 0.30 | 0.15 | 0.48 | 11 | 99% (151/152) |
| | R132C 5% | 4.44 | 0.30 | 0.00 | 0.56 | 13 | |
| | R132H 10% | 3.49 | 0.27 | 0.22 | 0.46 | 13 | 99% (151/152) |
| | R132C 10% | 3.69 | 0.27 | 0.23 | 0.53 | 14 | |
| | R132H 30% | 1.87 | 0.21 | 0.02 | 0.33 | 18 | 100% (152/152) |
| | R132C 30% | 2.00 | 0.26 | 0.28 | 0.59 | 29 | |

* R: Repeterbarhed.

† Kørsel: Repeterbarhed mellem kørsler.

‡ Total: Total præcision (herunder mellem instrumenter, mellem operatører og mellem lot).

Tabellen fortsættes på næste side

Tabel 17. Præcisionsresultater (fortsat)

| Analyse | Prøve | Middel-værdi ΔC_T | SD_R^* | $SD_{Kørsel}^\dagger$ | SD_{Total}^\ddagger | CV_{Total} (%) [‡] | Korrekte bestem- melses- forhold |
|-------------|-------|------------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|---|
| 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: Repeterbarhed.

† Kørsel: Repeterbarhed mellem kørsler.

‡ Total: Total præcision (herunder mellem instrumenter, mellem operatører og mellem lot).

Metodesammenligning

Sammenligning med IHC (Immunohistochemistry) for påvisning af *IDH1*/R132H.

Der blive udført en undersøgelse for at vise sammenfaldet mellem mutationsstatus som vurderet med *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR-kittet og med IHC (Anti-human *IDH1*R132H antistof-klon H09, DIANOVA).

Der blev valgt i alt 103 kliniske gliomprøver. Den ældste blok var 10 år gammel.

Alle prøver bestod kvalitetskontrollerne for både *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR-kittet og IHC.

Resultaterne viste en positiv overensstemmelse i procent (PPA) på 100 %, en negativ overensstemmelse i procent (NPA) på 98 % og en samlet overensstemmelse i procent (OA) på 99 % (Tabel 18).

Tabel 18. Analyse af overensstemmelse mellem *therascreen* RGQ PCR-kittet og IHC

| Måling af overensstemmelse | Hypighed (%) | 95 % konfidensinterval |
|----------------------------|---------------|------------------------|
| PPA | 45/45 (100%) | [92;100] |
| NPA | 57/58 (98%) | [91;100] |
| OA | 102/103 (99%) | [96;100] |

Sammenligning med bidirektional sekventering

Der blive udført en undersøgelse for at vise sammenfaldet mellem mutationsstatus som vurderet med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet og med bidirektional sekventering.

Der blev valgt i alt 103 kliniske tumorprøver fra gliompatienter. Den ældste blok var 10 år gammel.

Alle 103 prøver bestod kvalitetskontrollerne for *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet, og 101 prøver returnerede resultater for bidirektional sekventering.

Resultaterne viste en positiv overensstemmelse i procent (PPA) på 100 %, en negativ overensstemmelse i procent (NPA) på 92 % og en samlet overensstemmelse i procent (OA) på 96 % (Tabel 19 og 20).

Tabel 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet ift. bidirektional sekventering

| | | Sanger-bidirektional sekventering | | | | |
|---------------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|-------|-------|----|
| | | R132* | R132C | R132H | R172† | WT |
| <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR-kit | R132* | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | R132C | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | R132H | 0 | 0 | 42 | 0 | 3 |
| | R172† | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | WT | 0 | 0 | 0 | 0 | 47 |

* R132 betyder, at prøven blev fundet at være muteret for en R132-mutation, men ikke hverken R132H eller R132C.

† R172 betyder, at prøve blev fundet at være muteret for en R172-mutation, men ikke R172K.

Tabel 20. Analyse af overensstemmelse med bidirektional sekventering

| Måling af overensstemmelse | Hypighed (%) | 95 % konfidensinterval |
|----------------------------|--------------|------------------------|
| PPA | 50/50 (100%) | [93;100] |
| NPA | 47/51 (92%) | [81;97] |
| OA | 97/101 (96%) | [90;98] |

Referencer

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).

Symboler

Følgende tabel beskriver de symboler, som muligvis vises på etiketten eller i dette dokument.



<N>

Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> reaktioner



Anvendes inden



Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lot-nummer



Materialenummer (dvs. etiketten på komponenten)



Komponenter (dvs. en liste over de medfølgende komponenter)



Indeholder (indhold)



Antal (dvs. hætteglas, flasker)

Rn

R står for revision af håndbogen og n er revisionsnummeret



Globalt varenummer



Temperaturbegrænsning



Producent



Se de informationer, der er angivet i håndbogen



Forsigtig

Bestillingsinformation

| Produkt | Indhold | Kat. nr. |
|---|---|----------|
| <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20) | Til 20 reaktioner: 9 primer- og probeblandinger, WT-kontrol, positiv kontrol, mesterblanding, nukleasefrit vand | 873011 |
| Rotor-Gene Q MDx og tilbehør | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Real-time PCR-cyklusanordning og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, lilla) samt HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør, 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter; installation og uddannelse | 9002033 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform | Real-time PCR-cyklusanordning med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, lilla), bærbar computer, software, tilbehør, 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter; installation og uddannelse er ikke inkluderet | 9002032 |
| Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes | Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør | 9018901 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) | 250 bånd a 4 rør og hætter til 1.000 reaktioner | 981103 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500) | 10 x 250 bånd a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner | 981106 |
| QIAamp DNA FFPE Tissue-kit – til oprensning af genomisk DNA fra paraffinindstøbt væv | | |
| QIAamp DNA FFPE Tissue-kit | Til 50 DNA-klargøringer: 50 QIAamp | 56404 |

| Produkt | Indhold | Kat. nr. |
|--|---|----------|
| (50) | MinElute®-kolonner, proteinase K, buffere og indsamlingsrør (2 ml) | |
| QIASymphony DSP DNA Mini-kit – til automatisk oprensning af DNA fra 1-96 prøver | | |
| QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192) | Til 192 klargøringer af 200 µl hver: inklusive 2 reagensbeholdere og enzymrack og tilbehør | 937236 |
| QIASymphony SP og tilbehør | | |
| QIASymphony SP System | QIASymphony-prøveklargøringsmodul: inklusive installation og uddannelse, 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter | 9001751 |
| QIASymphony SP | QIASymphony-prøveklargøringsmodul: inklusive 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter | 9001297 |
| Sample Prep Cartridges, 8-well (336) | 8-brønds-prøveklargøringsbeholdere til brug med QIASymphony SP | 997002 |
| 8-Rod Covers (144) | 8-stangstildækninger til brug med QIASymphony SP | 997004 |
| Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024) | Engangsfilterspidser, i rack, (8 x 128). Til brug med QIAcube- og QIASymphony SP/AS-instrumenterne | 990332 |
| Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024) | Engangsfilterspidser, i rack, (8 x 128). Til brug med QIASymphony SP/AS-instrumenterne | 997024 |
| Elution Microtubes CL (24 x 96) | Ikke-sterile polypropylenrør (0,85 ml maks.-kapacitet, mindre end 0,7 ml opbevaringskapacitet, 0,4 ml elutionskapacitet); 2304 i rack med 96, | 19588 |

| Produkt | Indhold | Kat. nr. |
|---------------------|---|----------|
| | indeholder hættestrimler | |
| Reagenser | | |
| RNase A (17,500 U) | 2,5 ml (100 mg/ml, 7000 enheder/ml, opløsning) | 19101 |
| Buffer ATL (200 ml) | 200 ml vævslysebuffer til 1000 klargøringer | 19076 |

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller brugermanual. QIAGEN kit-håndbøger og brugermanualer kan fås via www.qiagen.com eller kan rekvireres hos QIAGEN Technical Services eller den lokale distributør.

Dette produkt er beregnet til in vitro-diagnostisk brug. QIAGEN-produkter må ikke videresælges, ændres til videresalg eller bruges til fremstilling af kommercielle produkter uden skriftlig tilladelse fra QIAGEN.

Oplysningerne i dette dokument kan ændres uden forudgående varsel. QIAGEN påtager sig intet ansvar for fejl, som kan findes i dette dokument. Dette dokument anses for at være fuldstændigt og nøjagtigt på tidspunktet for udgivelsen. QIAGEN er under ingen omstændigheder ansvarlig for tilfældige, særlige og adskillige skader eller følgeskader, som opstår i forbindelse med eller stammer fra brugen af dette produkt.

QIAGEN-produkter er garanteret at leve op til de specifikationer, der er angivet for dem. QIAGEN er udelukkende forpligtet til, og kunden kan kun kræve, afhjælpning i form af udskiftning af produkter vederlagsfrit i tilfælde af, at produkter ikke fungerer som garanteret.

Køb af dette produkt giver køberen ret til at bruge det til udførelse af diagnostiske tjenester inden for human in vitro-diagnostik. Der overdrages intet generelt patent eller andre licenser af nogen art udover denne specifikke brugret i forbindelse med købet.

IDH1/2-mutationer og brugen heraf er beskyttet af patentrettigheder, inklusive de europæiske patentansøgninger EP2326735 og EP2546365, amerikanske patentansøgninger US2011229479 og US2012202207 samt modsvarende fordringer i andre lande.

Købet af dette produkt overdrager ingen rettigheder til dets brug til kliniske forsøg for IDH1/2-målede lægemidler. QIAGEN udvikler specifikke licensprogrammer til sådan brug. Kontakt vores juridiske afdeling på ihlicenses@qiagen.com.

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

Aftale om begrænset licens til *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kittet

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må udelukkede bruges i overensstemmelse med de protokoller, der følger med produktet, samt denne håndbog, og må kun bruges med de komponenter, der medfølger i kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på www.qiagen.com. Nogen af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomskostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

For opdaterede licensbetingelser henvises til www.qiagen.com.

HB-1566-004 1075247 154034217 08/2016

© 2013–2016 QIAGEN. Alle rettigheder forbeholdes.

