

Auguste 2016

Manuel du kit *therascreen*[®] IDH1 /2 RGQ PCR



Version 1

Pour la détection de 12 mutations des gènes *IDH1* et *IDH2*
dans les gliomes

IVD

Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

Pour utilisation avec l'instrument Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex
HRM

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALLEMAGNE

R4 MAT

1075247FR

Sommaire

Utilisation prévue	4
Résumé et explication	4
Principe de la procédure	6
Matériel fourni	8
Contenu du kit	8
Matériel nécessaire mais non fourni	10
Avertissements et précautions	12
Informations de sécurité	12
Précautions générales	12
Stockage et manipulation des réactifs	14
Conditions d'expédition	14
Conservation	14
Stabilité	14
Stockage et manipulation des prélèvements	15
Procédure	16
Extraction et préparation de l'ADN	16
Protocole : détection des mutations d' <i>IDH1/2</i>	20
Interprétation des résultats	25
Contrôles eau	25
Contrôle qualité à l'aide des valeurs C_T des contrôles	25
Validation du traitement des échantillons	28
Résultats des échantillons	28

Guide de dépannage	34
Contrôle qualité	37
Limitations.....	37
Caractéristiques des performances.....	40
Limite du blanc (LoB)	40
Limite de détection (LoD).....	41
Effet de l'entrée d'ADN	42
Répétabilité et reproductibilité.....	42
Comparaison des méthodes.....	45
Références	48
Symboles	50
Pour commander	52

Utilisation prévue

Le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR est un test de diagnostic *in vitro* reposant sur la technologie de PCR et prévu pour la détection qualitative de 7 mutations du gène *IDH1* et de 5 mutations du gène *IDH2*, et pour l'identification directe de 3 mutations majeures dans de l'ADN extrait de tissus cérébraux humains fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE).

Le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR a été conçu pour faciliter la classification des gliomes.

Résumé et explication

Il est fréquent d'observer des mutations au niveau des gènes IDH (isocitrate déshydrogénase) *IDH1* et *IDH2* dans des gliomes de grades II et III de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et glioblastomes (GBM) secondaires de grade IV de l'OMS chez les patients adultes. Outre la valeur qu'elles représentent en matière de diagnostic, la présence de mutations de gènes *IDH1/2* est associée au pronostic positif des patients atteints de gliomes (1–13).

Le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR est un test destiné à la détection de 12 mutations de gènes *IDH1/2* spécifiques : 6 au niveau du codon 132 du gène *IDH1*, 5 au niveau du codon homologue 172 du gène *IDH2* et 1 au niveau du codon 100 du gène *IDH1* (tableau 1). Le kit permet également l'identification directe de mutations majeures des gènes *IDH1* et *IDH2* à l'origine de substitutions R132H d'*IDH1*, R132C d'*IDH1* et R172K d'*IDH2*.

Tableau 1. Mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* détectées à l'aide du kit *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR

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

* Les identifiants COSMIC sont tirés du *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (catalogue des mutations somatiques associées au cancer, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Principe de la procédure

Le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR fournit les réactifs nécessaires à la réalisation de 9 réactions distinctes d'amplification pour la détection de 12 mutations (tableau 1) :

- 3 réactions d'amplification totale dans les codons 132 et 100 du gène IDH1 et dans le codon 172 du gène IDH2
- 3 réactions d'amplification de mutation dans les codons 132 et 100 du gène IDH1 et dans le codon 172 du gène IDH2
- 3 réactions d'amplification spécifique aux mutations R132H et R132C d'IDH1 et R172K d'IDH2

Mélanges réactionnels totaux

Les mélanges sonde et amorces totaux (PPM-Total) utilisent des sondes et des amorces pour amplifier à la fois les séquences cibles mutées et de type sauvage (figure 1).

Mélanges réactionnels de détection des mutations

Les mélanges sonde et amorces de détection des mutations combinent sondes et amorces pour amplifier à la fois les séquences cibles mutées et de type sauvage, plus un oligonucléotide bloqué à l'extrémité 3' avec l'ajout d'un groupe de phosphates pour inhiber l'extension (clampage par PCR), spécifique à la séquence cible de type sauvage.

Lorsque la matrice destinée à la PCR contient la séquence de type sauvage, l'oligonucléotide 3'-phosphate domine la liaison avec les amorces de PCR en raison d'une plus grande affinité. L'extension et l'amplification dans le cas de l'ADN polymérase sont faibles voire inexistantes.

En présence d'une séquence mutée, la liaison d'amorce domine la liaison d'oligonucléotide 3'-phosphate et l'amplification se poursuit (figure 1).

Mélanges réactionnels d'identification des mutations

L'amplification spécifique d'allèle s'effectue par le biais du système ARMS (système de mutation réfractaire par amplification), qui exploite la capacité de l'ADN polymérase à

établir une distinction entre un appariement et un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR.

Lorsque l'amorce de PCR est entièrement appariée, l'efficacité de l'amplification est maximale. Lorsque la base 3' est mésappariée, seule une amplification entraînant un faible bruit de fond peut se produire (figure 1).

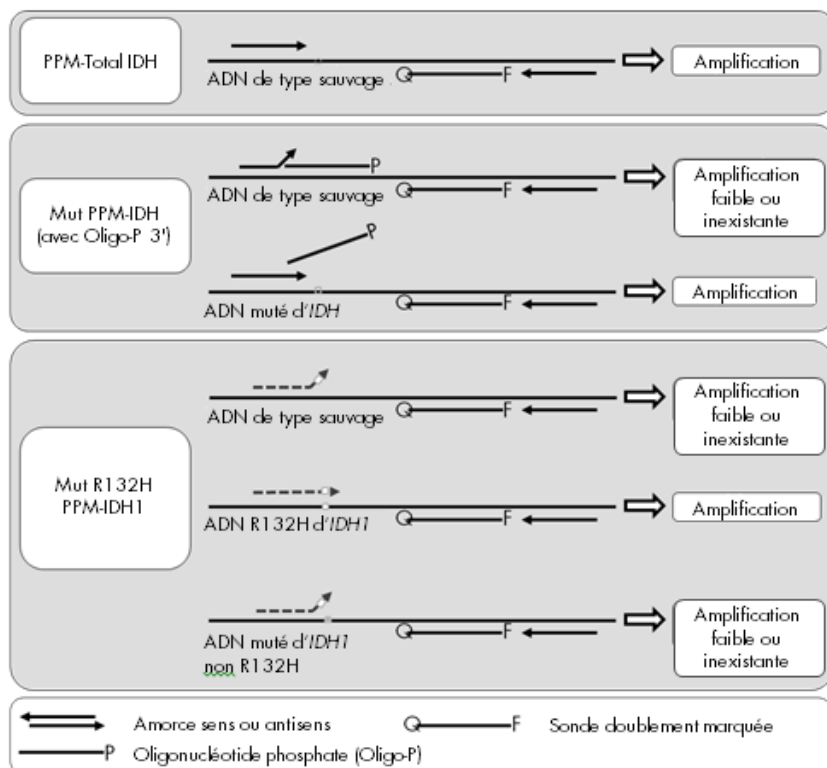


Figure 1. Résultats obtenus avec les mélanges sonde et amorces pour le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR. Le principe indiqué pour détecter la mutation R132H d'IDH1 est le même que pour les mutations R132C d'IDH1 et R172K d'IDH2.

Matériel fourni

Contenu du kit

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
N° de référence		873011
Nombre de réactions		20
Mélange sonde et amorces pour la détection d' <i>IDH1</i> total/R132 (type sauvage et muté)	PPM-Total <i>IDH1</i> /R132 25x	40 µl
Mélange sonde et amorces pour la détection d' <i>IDH2</i> total/R172 (type sauvage et muté)	PPM-Total <i>IDH2</i> /R172 25x	40 µl
Mélange sonde et amorces pour la détection d' <i>IDH1</i> total/R100 (type sauvage et muté)	PPM-Total <i>IDH1</i> /R100 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1</i> /R132	PPM- <i>IDH1</i> /R132 Mut 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH2</i> /R172	PPM- <i>IDH2</i> /R172 Mut 25x	40 µl
Primers and Probe mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1</i> /R100	PPM- <i>IDH1</i> /R100 Mut 25x	40 µl
Mélange sonde et amorces pour l'identification de la mutation R132H d' <i>IDH1</i>	PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x	40 µl

Suite du tableau sur la page suivante

Kit contents (continued)

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
N° de référence		873011
Nombre de réactions		20
Mélange sonde et amorces pour l'identification de la mutation R132C d' <i>IDH1</i>	PPM-IDH1 Mut R132C 25x	40 µl
Mélange sonde et amorces pour l'identification de la mutation R172K d' <i>IDH2</i>	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
ADN génomique de type sauvage <i>IDH1/IDH2</i>	Contrôle de type sauvage <i>IDH1/IDH2</i>	270 µl
Contrôle positif de mutation d' <i>IDH1/IDH2</i>	Contrôle positif <i>IDH1/IDH2</i>	270 µl
Mélange incluant la <i>Taq</i> ADN polymérase, les dNTP, MgCl ₂ et le tampon de qPCR	qPCR Master Mix 2x	5 x 900 µl
Eau sans nucléase	Nuclease-Free Water	5 x 525 µl
Manuel du kit <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR (anglais)		1

Matériel nécessaire mais non fourni

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

Important : S'assurer que les instruments utilisés dans cette procédure ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

Réactifs (extraction manuelle d'ADN)

- Kit d'extraction d'ADN : Kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (n° réf. 56404)
- RNase A (17 500 U) (n° réf. 19101)
- Xylène ou Histolemon™ (Carlo Erba, n° réf. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Éthanol (96–100 %)
- 1x tampon TE, pH 8,0

Réactifs (extraction automatisée d'ADN)

- Kit d'extraction d'ADN : QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (n° réf. 937236)
- Tampon ATL (n° réf. 19076 ou 939016)
- RNase A (n° réf. 19101)
- Xylène ou Histolemon (Carlo Erba, n° réf. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Éthanol (96–100 %)
- 1x tampon TE, pH 8,0

Consommables

- Scalpels

- Cônes de pipette pour PCR avec filtre hydrophobe, stériles, exempts de nucléase et aérosol-résistants
- Tubes sans nucléase de 2,0 ml ou 1,5 ml
- Barrettes de tubes et de capuchons de 0,1 ml pour l'instrument Rotor-Gene Q (n° de réf. 981 103 ou 981 106)
- Glace

Consommables supplémentaires pour l'extraction automatisée d'ADN

- Cartouches de préparation d'échantillons à 8 puits (n° réf. 997002)
- Manchons pour 8 barreaux (n° réf. 997004)
- Embouts à filtres, 200 µl, Qsym SP (n° réf. 990332) et embouts à filtres, 1 500 µl, Qsym SP (n° réf. 997024)
- Microtubes d'élution CL (n° réf. 19 588)
- Microtubes 2,0 ml type H (Sarstedt®, n° réf. 72.693, www.sarstedt.com)

Équipement

- Portoir de lames et 2 baignoires de lames compatibles avec le xylène/l'Histolemon et l'éthanol
- Micropipettes conçues pour la PCR (1–10 µl ; 10–100 µl ; 100–1 000 µl)
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour tubes de réaction et microplaques de 0,5 ml/1,5 ml (capable d'atteindre 13 000 à 14 000 tr/min)
- Agitateur de paillasse
- Instrument de PCR en temps réel : Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM et matériel spécifique associé
- Logiciel Rotor-Gene Q MDx, version 2.1.0 ou supérieure
- Biophotomètre
- Thermomixeur, incubateur orbital chauffé, bloc chauffant ou bain-marie capable d'incuber à 56 °C et 90 °C

Équipement supplémentaire pour une purification automatisée

- Instrument QIASymphony SP*
Logiciel QIASymphony SP version 4.0 ou supérieure

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

Informations de sécurité

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

Pour des informations de sécurité concernant le kit de purification utilisé, consulter le manuel du kit correspondant. Pour des informations de sécurité concernant les instruments, consulter le manuel d'utilisation de l'instrument correspondant.

Précautions générales

- Le test est destiné à une utilisation avec des prélèvements de tissu tamponné de résection chirurgicale, fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE).
- Tous les produits chimiques et biologiques sont potentiellement dangereux. Les prélèvements et échantillons présentent un risque potentiel d'infection et doivent être traités comme du matériel présentant un risque biologique.
- Jeter les échantillons et les tests usagés conformément aux procédures de sécurité locales.
- Les réactifs du kit theascreen IDH1/2 RGQ PCR sont dilués de manière optimale. Ne pas effectuer de dilution supplémentaire des réactifs : celle-ci pourrait entraîner une

baisse des performances. Ne pas utiliser de volume réactionnel (mélange réactionnel + échantillon) inférieur à 25 µl.

- Tous les réactifs fournis dans le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit. Ne pas interchanger les réactifs des kits *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR, au risque de réduire les performances.
- Consulter le manuel d'utilisation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM pour plus d'informations sur les avertissements, précautions et procédures.
- Une altération de l'incubation et des températures peut provoquer des données erronées ou discordantes.
- Ne pas utiliser de composants périmés ou mal conservés.
- Les mélanges sonde et amorces peuvent être altérés s'ils sont exposés à la lumière.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination des mélanges avec le matériel synthétique contenu dans le réactif de contrôle positif.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination par la DNase, qui peut provoquer la dégradation de l'ADN de contrôle.
- Utiliser des pipettes individuelles spéciales pour préparer les mélanges réactionnels et ajouter les matrices.
- Effectuer la préparation et la distribution des mélanges réactionnels dans une zone séparée de celle de l'ajout des matrices.
- Ne pas ouvrir l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM avant la fin de l'analyse.
- Ne pas ouvrir les tubes Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM après la fin de l'analyse.
- Faire preuve de prudence pour garantir un test correct des échantillons. Une attention toute particulière doit être accordée aux mauvaises entrées d'échantillons ainsi qu'aux erreurs de chargement ou de pipetage.

Stockage et manipulation des réactifs

Conditions d'expédition

Le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR est expédié sur un lit de glace sèche. Si un des composants du kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR n'est pas congelé dès l'arrivée, que l'emballage extérieur a été ouvert au cours du transport, que le colis ne contient pas de notice d'emballage, de manuel ou de réactifs, prière de contacter l'un des départements de support technique ou l'un des distributeurs locaux de QIAGEN (visiter le site www.qiagen.com).

Conservation

Le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR doit être stocké dès réception à une température comprise entre -15 °C et -30 °C dans un congélateur à température constante et à l'abri de la lumière.

Stabilité

Lorsqu'il est stocké dans les conditions de conservation spécifiées, le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR est stable jusqu'à la date de péremption indiquée.

Une fois ouverts, les réactifs peuvent être conservés dans leur emballage d'origine à une température comprise entre -15 et -30 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. Éviter la congélation et décongélation à répétition. Ne pas dépasser un maximum de 5 cycles de congélation/décongélation.

Stockage et manipulation des prélèvements

Le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR est destiné à une utilisation avec des échantillons d'ADN extraits de tissu tumoral fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE) de résections chirurgicales prélevées sur des patients atteints de cancer du cerveau. Tous les échantillons de tissu doivent être considérés comme potentiellement dangereux.

- Fixer les échantillons de tissus à 4 à 10 % de formaldéhyde neutre tamponné.
- Faire des coupes sériées de 10 µm dans le bloc de paraffine et les placer sur des lames en verre.
- Solliciter un professionnel expérimenté (par ex. un pathologiste) pour évaluer une coupe colorée à l'hématoxyline-éosine afin d'y déceler un contenu tumoral et d'en déterminer la surface. Utiliser les coupes sériées pour l'extraction d'ADN.
- Seules les coupes avec ≥ 40 % de contenu tumoral peuvent être testées.
- Pour les coupes contenant une surface de tissu < 50 mm², il est recommandé de traiter un nombre suffisant de coupes pour augmenter la surface de tissu totale afin qu'elle atteigne au moins 50 mm² (100 mm² pour une extraction automatisée avec le système QIASymphony SP).
- Marquer, manipuler et conserver les prélèvements tumoraux, blocs, lames et échantillons prêts à l'extraction de manière contrôlée conformément aux procédures locales.
- Conserver les blocs et lames FFPE à température ambiante. Les lames peuvent être conservées à température ambiante jusqu'à 4 semaines avant l'extraction d'ADN pour une utilisation avec le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR.
- Après l'extraction, l'ADN génomique peut être conservé jusqu'à une semaine à une température comprise entre 2 et 8 °C, ou 8 semaines entre -15 et -25 °C.

Procédure

Extraction et préparation de l'ADN

Utiliser le kit QIAamp DNA FFPE Tissue (n° de réf. 56404) ou le QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n° de réf. 937236) pour la purification de l'ADN génomique d'échantillons préparés à partir de prélèvements de tissu FFPE du cancer du cerveau.

Remarque : le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR n'a été validé que pour une utilisation conjointe avec le kit QIAamp DNA FFPE Tissue ou le QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Ne pas utiliser d'autre produit d'extraction d'ADN.

Utilisation du kit QIAamp DNA FFPE Tissue



Prière de lire attentivement les modifications suivantes devant être appliquées au protocole QIAamp.

- Consulter les sections « Matériel de départ » du Manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue et « Stockage et manipulation des prélèvements », page 15 du présent manuel, pour la préparation des échantillons avant la déparaffinisation et l'extraction d'ADN.
- Le kit QIAamp DNA FFPE Tissue doit être utilisé manuellement uniquement.
- L'étape de RNase décrite dans le Manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue est obligatoire.
- Ne pas utiliser la solution de déparaffinisation QIAGEN. Utiliser uniquement une méthode au xylène/à l'éthanol pour la déparaffinisation, comme indiqué à la section « Procédure de déparaffinisation des lames dans le cadre de l'utilisation du kit QIAamp DNA FFPE Tissue » ci-dessous. Il est possible de remplacer le xylène par l'Histolemon (produit de substitution au xylène).
- La digestion de la protéinase K doit être effectuée pendant 1 heure.

- Les échantillons doivent être élués deux fois dans 30 µl de tampon d'éluion (tampon ATE) du kit QIAamp DNA FFPE Tissue.

Procédure de déparaffinisation des lames dans le cadre de l'utilisation du kit QIAamp DNA FFPE Tissue

1. Placer les lames dans un portoir de lames spécifique.
2. Placer le portoir de lames dans un bain de lames contenant du xylène ou de l'Histolemon pendant 2 minutes. Agiter par 2 ou 3 mouvements d'avant en arrière.
3. Placer le portoir dans un second bain de lames contenant de l'éthanol (96 à 100 %) pendant 2 minutes. Agiter par 2 ou 3 mouvements d'avant en arrière.
4. Sécher les lames à une température comprise entre 15 et 37 °C. Cette opération prend quelques minutes.
5. Marquer des tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml pour chaque échantillon, et ajouter 180 µl de tampon ATL (du kit QIAamp DNA FFPE Tissue) à chaque tube.
6. Placer quelques gouttes de tampon ATL sur les coupes de tissu sur les lames (suffisamment pour couvrir la surface de tissu).
7. Gratter la zone de tissu avec un scalpel stérile et ajouter le tissu gratté au tube de microcentrifugeuse marqué correspondant.
8. Ajouter 20 µl de protéinase K (du kit QIAamp DNA FFPE Tissue) à chaque tube, et mélanger à l'agitateur.
9. Incuber à 56 °C pendant 1 heure.

Poursuivre avec l'étape d'incubation à 90 °C du protocole du kit QIAamp DNA FFPE Tissue (étape 12 du *Manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue*, juin 2012, page 13).

Utilisation du QIASymphony DSP DNA Mini Kit



Prière de lire attentivement les modifications suivantes devant être appliquées à la fiche de protocole QIASymphony SP :
Tissue_IC_200_V7_DSP.

- Voir « Stockage et manipulation des prélèvements », page 15, pour la préparation des échantillons avant la déparaffinisation et l'extraction d'ADN.
- L'étape de RNase décrite dans la fiche de protocole QIASymphony SP est obligatoire.
- Ne pas utiliser la solution de déparaffinisation QIAGEN. Utiliser uniquement une méthode au xylène/à l'éthanol pour la déparaffinisation, comme indiqué à la section « Procédure de déparaffinisation des lames dans le cadre de l'utilisation du QIASymphony DSP DNA Mini Kit » ci-dessous. Il est possible de remplacer le xylène par l'Histolemon (produit de substitution au xylène).
- La digestion de la protéinase K doit être effectuée pendant 1 heure.
- Le volume d'éluion de 50 µl doit être sélectionné sur l'écran tactile.

Procédure de déparaffinisation des lames dans le cadre de l'utilisation du QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Procéder à la déparaffinisation conformément aux étapes suivantes, qui diffèrent du protocole indiqué dans la fiche de protocole QIASymphony SP : Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Placer les lames dans un portoir de lames spécifique.
2. Placer le portoir de lames dans un bain de lames contenant du xylène ou de l'Histolemon pendant 2 minutes. Agiter par 2 ou 3 mouvements d'avant en arrière.
3. Placer le portoir dans un second bain de lames contenant de l'éthanol (96 à 100 %) pendant 2 minutes. Agiter par 2 ou 3 mouvements d'avant en arrière.
4. Sécher les lames à une température comprise entre 15 et 37 °C. Cette opération prend quelques minutes.
5. Marquer des tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml pour chaque échantillon, et ajouter 220 µl de tampon ATL à chaque tube.
6. Placer quelques gouttes de tampon ATL sur les coupes de tissu sur les lames (suffisamment pour couvrir la surface de tissu).
7. Gratter la zone de tissu avec un scalpel stérile et ajouter le tissu gratté au tube de microcentrifugeuse marqué correspondant.

8. Ajouter 20 µl de protéinase K (du kit QIAamp DNA FFPE Tissue) à chaque tube, et mélanger à l'agitateur.

Continue with the 56°C incubation step in the QIA Symphony SP Protocol Sheet: Tissue_LC_200_V7_DSP protocol (step 12 in the "Deparaffinization using xylene" protocol, April 2012). Incubate at 56°C for 1 hour.

ADN génomique

Conserver l'ADN génomique à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant la semaine suivant l'extraction, puis à une température comprise entre -15 et -25 °C.

Déterminer la quantité d'ADN en mesurant la densité optique (DO) de l'échantillon à 260 nm.

Diluer l'ADN à une concentration de 5 ng/µl dans 1x tampon TE à un pH de 8,0.

La réaction de PCR est optimisée pour les échantillons contenant 25 ng d'ADN génomique purifié.

Protocole : détection des mutations d'IDH1/2

Points importants avant de commencer

- Pour une utilisation optimale du kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR, les échantillons doivent être regroupés en lots de 4. Avec des lots plus petits, moins d'échantillons pourront être testés avec le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR.
- Nous recommandons de tester tous les échantillons une fois par analyse PCR, comme indiqué dans le tableau 2 et d'utiliser un agencement de bloc de chargement et une configuration de rotor comme indiqué dans le tableau 3 et la figure 2.

Tableau 2. Nombre de réactions pour les instruments Rotor-Gene Q MDx avec rotor à 72 tubes

Échantillons	Réactions
n échantillons d'ADN	n x 1 réactions
2 ADN de contrôle	2 réactions : contrôles positif et de type sauvage, chacun testé une fois par analyse PCR
Contrôle eau	1 réaction

Tableau 3. Suggestion de bloc de chargement pour une expérience avec le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ

Échantillon	Total IDH1/ R132		IDH1 Mut R132H		IDH1 Mut R132C		Total IDH2/ R172		IDH2/ R172 Mut		Total IDH2 Mut R172K		Total IDH1/ R100
	R132	Mut R132	Mut R132H	Mut R132C	Total IDH2/ R172	IDH2/ R172 Mut	Total IDH2 Mut R172K	IDH2 Mut R172K					
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				
Tube vide	8	16	24	32	40	48	56	64	72				

* PC : contrôle positif

† WTC : contrôle de type sauvage

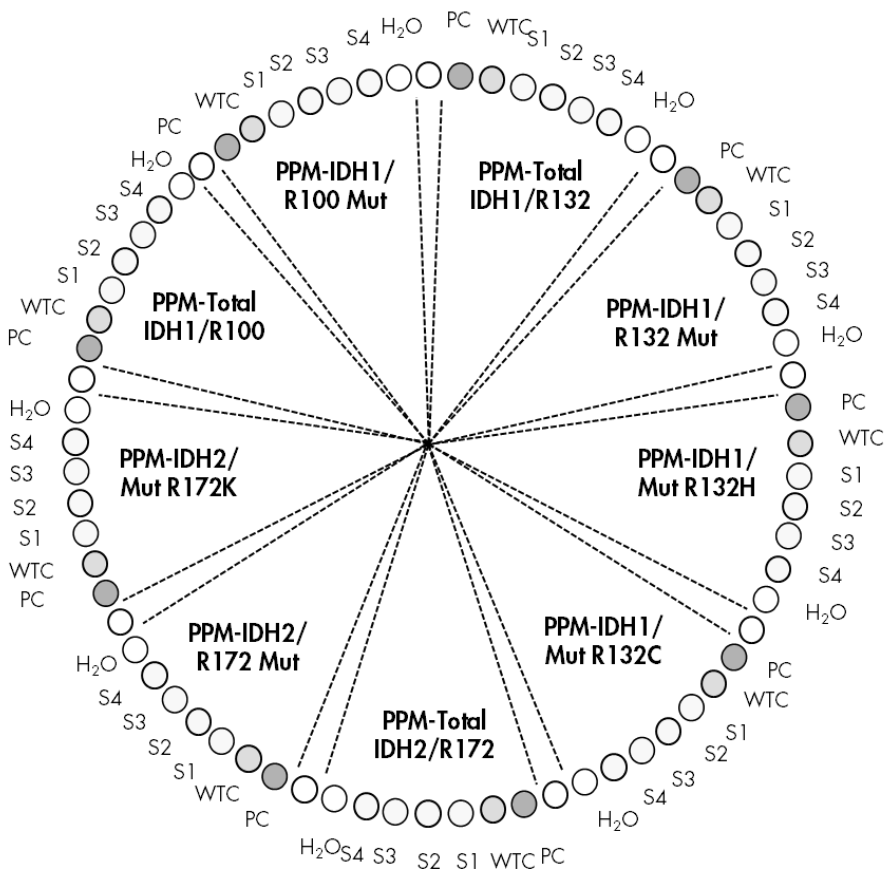


Figure 2. Suggestion de configuration de rotor pour une expérience avec le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR.

Remarque : veiller à toujours placer un échantillon en position n° 1 du rotor. Dans le cas contraire, l'instrument n'effectuera pas de calibration et des données de fluorescences erronées seront acquises.

Procédure

1. Décongeler tous les composants nécessaires et les placer sur de la glace.
2. Préparer les mélanges de PCR suivants selon le nombre d'échantillons à tester.

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 4 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 µl. Il est possible de préparer un pré-mélange pour chaque PPM, selon le nombre de réactions. Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 4. Préparation des mélanges de PCR

Composant	Pré-mélange :*		
	1 réaction (µl)	7 + 1 réactions (µl)	Concentration finale
qPCR Master Mix, 2X	12.5	100	1x
PPM, * 25x	1	8	1x
Eau sans nucléase	6.5	52	–
Échantillon ou contrôle† (à ajouter à l'étape 4)	5	5 chacun	–
Volume total	25	25 chacun	–

* Préparer 9 pré-mélanges, un pour chaque PPM fourni dans le kit.

† Contrôle positif, contrôle négatif ou contrôle eau.

3. Verser 20 µl de la solution du pré-mélange par tube Rotor-Gene (Tableau 3).
4. Ajouter 5 µl du matériel à quantifier (25 ng d'échantillon d'ADN génomique ou de contrôle) dans le tube correspondant (volume total 25 µl; Tableau 3).
5. Mélanger doucement en pipetant.
6. Placer les tubes dans l'adaptateur fourni avec l'instrument (Figure 2).
Les positions inutilisées doivent être remplies avec des tubes vides.
7. Charger l'adaptateur plein dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

8. Programmer l'instrument Rotor-Gene Q MDx avec le programme de thermocyclage comme indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5. Profil de température

Attente	Température : 95 °C Temps : 10 min
Cycle	40 fois 95 °C pendant 15 secondes 60 °C pendant 60 secondes avec acquisition d'une fluorescence FAM™ dans le canal Green : Single

9. Cliquer sur « **Gain Optimisation** » (Optimisation de l'augmentation) dans la boîte de dialogue « **New Run Wizard** » (Assistant nouvelle analyse) pour ouvrir la boîte de dialogue « **Auto-Gain Optimisation Setup** » (Réglage optimisation auto de l'augmentation). Définir l'intervalle pour le canal Green de 1FI pour « **Min reading** » (lecture minimale) à 10FI pour « **Max Reading** » (lecture maximale).
10. Cocher la case « **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** » (effectuer optimisation avant 1^{ère} acquisition) puis fermer la boîte de dialogue « **Auto-Gain Optimisation Setup** ».
11. Démarrer le programme de thermocyclage.
12. Une fois le thermocyclage terminé, effectuer les actions suivantes.
 - Sélectionner « **Options** » et « **Crop start cycles** » (effacer cycles de démarrage). Supprimer les données avant le cycle 10 afin d'éliminer tout artefact.
 - Sélectionner « **Analysis** » et « **Cycling A. Green from 10** » (Cycle A vert à partir de 10), indiqué sur le rapport comme « **left threshold = 10.00** » (seuil restant : 10,00).
 - Sélectionner « **dynamic tube** » (tube dynamique) comme méthode de normalisation et « **Slope Correct** » (Pente correcte) pour corriger la pente de bruit.
 - Définir le « **Outlier removal** » (suppression des aberrations) à 0 % (correspondant au seuil du NTC).
 - Désactiver le « **Reaction Efficiency Threshold** » (seuil d'efficacité de la réaction).
 - Définir le seuil à **0,03**.

- Définir le graphique en échelle linéaire (« Linear scale »).
- Sélectionner « **Digital Filter: Light** » (filtre numérique : léger).

Interprétation des résultats

Contrôles eau

Les contrôles eau (contrôles négatifs) doivent donner des valeurs C_T de zéro pour tous les mélanges sonde et amorces.

Si une valeur C_T positive est obtenue avec un contrôle eau, elle résulte d'une contamination croisée. Voir « Guide de dépannage », page 34 pour trouver une solution.

Contrôle qualité à l'aide des valeurs C_T des contrôles

Le contrôle de type sauvage *IDH1/2* (WTC) et les contrôles positifs mutés *IDH1/2* (Mut-PC) permettent de nuancer une expérience.

Pour chaque contrôle, calculer les valeurs ΔC_T comme suit.

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

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

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

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

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

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

Si une valeur C_T de 0 est obtenue pour un échantillon, utiliser une valeur C_T de 40 pour calculer la valeur ΔC_T .

Les contrôles sont considérés comme positifs à la mutation si les valeurs ΔC_T sont inférieures ou égales aux valeurs ΔC_T seuils répertoriées dans le tableau 6.

Tableau 6. Valeurs seuils pour chaque test de mutation

Test de mutation	Seuil (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

- Le contrôle de type sauvage IDH1/2 doit être détecté comme négatif à la mutation pour chaque test de mutation (Tableau 7).
- Le contrôle positif muté IDH1/2 doit être détecté comme positif à la mutation pour chaque test de mutation (Tableau 7).

L'ensemble de l'expérience est rejeté si aucune des conditions n'est remplie.

Tableau 7. Exemple de validation sur contrôles

	Eau (NTC)	Contrôle de type sauvage IDH1/IDH2	Contrôle positif IDH1/IDH2
C _T Total IDH1/R132	Non détecté	25.45	23.95
C _T IDH1/R132 Mut	Non détecté	34.32	25.76
ΔC _T IDH1/R132 Mut	Non détecté	8.87	1.81
C _T Total IDH2/R172	Non détecté	25.42	24.93
C _T IDH2/R172 Mut	Non détecté	34.36	26.36
ΔC _T IDH2/R172 Mut	Non détecté	8.94	1.43
C _T Total IDH1/R100	Non détecté	26.30	24.69
C _T IDH1/R100 Mut	Non détecté	33.04	26.39
ΔC _T IDH1/R100 Mut	Non détecté	6.74	1.70
C _T IDH1 Mut R132H	Non détecté	35.20	26.48
ΔC _T IDH1 Mut R132H	Non détecté	9.75	2.53
C _T IDH1 Mut R132C	Non détecté	37.16	27.07
ΔC _T IDH1 Mut R132C	Non détecté	11.71	3.12
C _T IDH2 Mut R172K	Non détecté	40.00	27.97
ΔC _T IDH2 Mut R172K	Non détecté	14.58	3.04

Validation du traitement des échantillons

Le traitement des échantillons doit être validé avant son interprétation.

La valeur C_T obtenue pour un échantillon avec PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ et $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) doit être inférieure à 32,00. Les valeurs $C_{T \text{ Total}} \geq 32,00$ sont dues à un ADN de mauvaise qualité. L'échantillon doit alors être testé à nouveau. Si la quantité d'ADN est toujours insuffisante, extraire davantage de tissu tumoral si possible (voir « Guide de dépannage », page 34).

Résultats des échantillons

Détection des mutations d'*IDH1/2*

Pour chacun des échantillons, calculer les valeurs ΔC_T obtenues avec chaque test de détection des mutations (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut) comme suit.

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

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

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

Si une valeur C_T de 0 est obtenue pour un échantillon, utiliser une valeur C_T de 40 pour calculer la valeur ΔC_T .

Les échantillons sont considérés comme positifs à la mutation si la valeur ΔC_T est inférieure ou égale à la valeur ΔC_T seuil du test de détection des mutations correspondant, indiquée dans le tableau 8.

Tableau 8. Valeurs seuils pour chaque test de détection des mutations

Test de mutation	Seuil (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5.34
IDH2/R172 Mut	6.42
IDH1/R100 Mut	4.65

Identification des mutations d'*IDH1/2*

Pour chacun des échantillons, calculer les valeurs ΔC_T obtenues avec chaque test d'identification des mutations (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K) comme suit.

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

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

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

Si une valeur C_T de 0 est obtenue pour un échantillon, utiliser une valeur C_T de 40 pour calculer la valeur ΔC_T .

La mutation de l'échantillon est identifiée si la valeur ΔC_T est inférieure ou égale à la valeur ΔC_T seuil du test d'identification des mutations correspondant, indiquée dans le tableau 9. Des exemples d'interprétation de ΔC_T sont présentés dans les tableaux 10 et 11.

Tableau 9. Valeurs seuils pour chaque test d'identification des mutations

Test de mutation	Seuil (ΔC_T)
IDH1 Mut R132H	6.87
IDH1 Mut R132C	7.14

Test de mutation	Seuil (ΔC_T)
IDH2 Mut R172K	8.49

Tableau 10. Exemple de détection des mutations d'IDH1/2

Valeur	Échantillon 1	Échantillon 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
Détection de mutation	Pas de mutation détectée	Mutation R132 détectée

Tableau 11. Exemple d'identification des mutations d'IDH1/2

Valeur	Échantillon 1	Échantillon 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
Identification de la mutation	Pas de mutation détectée	Mutation détectée pour R132H

Interprétation des mutations d'IDH1/2

La procédure utilisée pour attribuer le type de mutation d'IDH1/2 à des échantillons positifs à une mutation d'IDH1/2 est indiquée au tableau 12. Le tableau 13 montre un exemple d'interprétation.

Tableau 12. Guide d'interprétation

		Identification de la mutation			
		IDH1 Mut R132H détectée	IDH1 Mut R132C détectée	IDH2 Mut R172K détectée	Pas de mutation détectée
Mutation détectée	Mutation R132 détectée	Mutation R132H détectée	Mutation R132C détectée	–	Mutation R132, mais ni R132H ni R132C
	Mutation R172 détectée	–	–	Mutation R172K détectée	Mutation R172, mais pas R172K
	Mutation R100 détectée	–	–	–	R100
	Pas de mutation détectée	Faible quantité de mutation R132H détectée (entre 1 et 2 %)*	Faible quantité de mutation R132C détectée (entre 1 et 4 %)*	Faible quantité de mutation R172K détectée (environ 1 %)*	Pas de mutation détectée

* Ces cas peuvent être rares, et tous les échantillons et critères d'acceptation techniques doivent être vérifiés, en particulier le contenu de la cellule tumorale. Si tous les critères sont réunis, l'échantillon doit être retesté.

Tableau 13. Exemple de rapport et d'interprétation des mutations d'IDH1/2

	Échantillon 1	Échantillon 2
Détection de mutation	Pas de mutation détectée	Mutation R132 détectée
Identification de la mutation	Pas de mutation détectée	Mutation détectée pour R132H
Interprétation des résultats	Aucune mutation détectée ou identifiée	R132H muté

Remarque : si un échantillon a au moins 2 valeurs ΔC_T inférieures ou égales aux valeurs ΔC_T seuils, l'état mutationnel est attribué à la mutation présentant la plus grande différence entre le seuil et la valeur ΔC_T obtenue. Voir exemple dans le tableau 14.

Tableau 14. Exemple d'interprétation en cas de résultats positifs multiples

	Échantillon 3	Échantillon 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
Interprétation des résultats	R132 muté	R172 muté

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

Commentaires et suggestions

Colonne pleine lors de l'extraction d'ADN

Lyse incomplète	Répéter la centrifugation. Le lysat restant peut être transféré vers une nouvelle colonne. Répéter l'extraction avec une quantité plus faible de tissu FFPE.
-----------------	--

Quantité d'ADN insuffisante dans l'éluat d'extraction

Zone de tissu FFPE insuffisante	Répéter l'extraction avec davantage de coupes de tissu FFPE.
---------------------------------	--

Contrôle *IDH1/2* WT non détecté

- | | |
|--|---|
| a) Erreurs de pipetage ou réactifs omis ; inversion de tubes ou de puits | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.
Répéter l'expérience de PCR. |
| b) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit | Conserver le kit <i>therascreen</i> <i>IDH1/2</i> RGQ PCR entre -15 et -30 °C et conserver les mélanges sonde et amorces à l'abri de la lumière. Voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 14.
Ne pas dépasser un maximum de 5 cycles de congélation/décongélation. |
| c) Le kit <i>therascreen</i> <i>IDH1/2</i> RGQ PCR a expiré | Vérifier les conditions de stockage et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et, si nécessaire, utiliser un nouveau kit <i>therascreen</i> <i>IDH1/2</i> RGQ PCR. |

Commentaires et suggestions

Contrôle positif *IDH1/2* non détecté

- | | |
|--|---|
| a) Erreurs de pipetage ou réactifs omis ; inversion de tubes ou de puits | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.
Répéter l'expérience de PCR. |
| b) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit | Conserver le kit <i>therascreen</i> <i>IDH1/2</i> RGQ PCR entre -15 et -30 °C et conserver les mélanges sonde et amorces à l'abri de la lumière. Voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 14.
Ne pas dépasser un maximum de 5 cycles de congélation/décongélation. |
| c) Le kit <i>therascreen</i> <i>IDH1/2</i> RGQ PCR a expiré | Vérifier les conditions de stockage et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et, si nécessaire, utiliser un nouveau kit <i>therascreen</i> <i>IDH1/2</i> RGQ PCR. |

Aucun signal, même pour les contrôles

- | | |
|--|---|
| a) Aucun tube de réaction en position 1 de l'instrument Rotor-Gene Q MDx | Veiller à toujours placer un échantillon en position n° 1 du rotor. Dans le cas contraire, l'instrument n'effectuera pas de calibration et des données de fluorescences erronées seront acquises. |
| b) Erreurs de pipetage ou réactifs omis ; inversion de tubes ou de puits | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.
Répéter l'expérience de PCR. |
| c) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit | Conserver le kit <i>therascreen</i> <i>IDH1/2</i> RGQ PCR entre -15 et -30 °C et conserver les mélanges sonde et amorces à l'abri de la lumière. Voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 14.
Ne pas dépasser un maximum de 5 cycles de congélation/décongélation. |
| d) Le kit <i>therascreen</i> <i>IDH1/2</i> RGQ PCR a expiré | Vérifier les conditions de stockage et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et, si nécessaire, utiliser un nouveau kit <i>therascreen</i> <i>IDH1/2</i> RGQ PCR. |

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|--|
| e) Canal de détection choisi incorrect | Définir le canal de détection sur Cycling Green ou 530 nm/640 nm. |
| f) Aucun programme d'acquisition des données | Vérifier la programmation des cycles. Voir « Tableau 5. », page 24.
Sélectionner le mode d'acquisition « Single » à la fin de chaque phase d'hybridation de la PCR. |

L'intensité de fluorescence varie

- | | |
|---|--|
| Erreurs de pipetage ou réactifs omis ; inversion de tubes ou de puits | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.
Répéter l'expérience de PCR. |
|---|--|

L'intensité de fluorescence est trop faible

- | | |
|--|--|
| a) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit | Conserver le kit <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR entre -15 et -30 °C et conserver les mélanges sonde et amorces à l'abri de la lumière. Voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 14.
Ne pas dépasser un maximum de 5 cycles de congélation/décongélation. |
| b) Le kit <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR a expiré | Vérifier les conditions de stockage et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et, si nécessaire, utiliser un nouveau kit <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR. |
| c) Quantité très faible d'ADN cible | Toujours vérifier la concentration de l'ADN avant analyse. Voir « Extraction et préparation de l'ADN », page 16. |

Commentaires et suggestions

Le contrôle négatif (H₂O) donne un résultat positif

Contamination croisée,
contamination des réactifs,
erreur de l'instrument,
inversion de puits ou de
capillaire, ou dégradation
de la sonde

Remplacer tous les réactifs critiques ou utiliser un nouveau kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR.

Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables en accord avec les pratiques communément admises pour prévenir les contaminations croisées.

Conserver les mélanges sonde et amorces à l'abri de la lumière.

Vérifier les faux positifs sur les courbes de fluorescence.

Vérifier la préparation de la réaction.

Voir « Protocole : détection des *mutations* d'*IDH1/2* », page 20.

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot du kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit. Les certificats d'analyse sont disponibles sur demande à l'adresse suivante : www.qiagen.com/support.

Limitations

Ce kit est réservé à un usage professionnel.

Le produit est destiné à être utilisé uniquement par le personnel ayant reçu les instructions et la formation spécialement liées aux techniques de biologie moléculaires et étant familiarisé avec cette technologie.

Ce kit doit être utilisé selon les instructions données dans ce manuel, en combinaison avec les instruments validés mentionnés sous « Matériel nécessaire mais non fourni », page 10.

Il est important de respecter les dates de péremption imprimées sur les boîtes et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants périmés.

Le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR n'est validé que pour les tissus cérébraux fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine.

Le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR n'est validé que pour une utilisation avec le kit QIAamp DNA FFPE Tissue ou le QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Seuls les instruments Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (pour la PCR) et QIASymphony SP (pour la préparation des échantillons) ont été validés.

Toute utilisation non conforme avec les informations portées sur l'étiquetage ou la notice de ce produit, et/ou modification quelconque de l'un de ses composants, décharge QIAGEN de toute responsabilité.

L'utilisateur est responsable de la validation des performances du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN.

Le test est conçu pour détecter 7 mutations dans les codons 132 et 100 du gène *IDH1* et 5 mutations dans le codon 172 du gène *IDH2*. Les échantillons dont les résultats sont rapportés comme « no mutation detected » peuvent présenter des mutations *IDH1* ou *IDH2* non détectées par le test.

La détection des mutations dépend de l'intégrité des échantillons, du contenu tumoral et de la quantité d'ADN amplifiable présent dans le prélèvement.

Tout résultat de diagnostic généré avec le produit doit être interprété en tenant compte de tout autre résultat clinique ou de laboratoire correspondant.

Caractéristiques des performances

Limite du blanc (LoB)

La limite du blanc (LoB) a été déterminée (d'après la directive du CLSI/NCCLS EP17-A; 14) sur les échantillons négatifs (tissus cérébraux normaux FFPE, 8 échantillons, 64 mesures/lot, 2 lots).

Les résultats de la LoB sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15. Limite du blanc (LoB)

Assay	LOB	Final LOB
R132 Mut	Lot de validation 1: 6.57	6.32
	Lot de validation 2: 6.32	
R132H Mut	Lot de validation 1: 7.91	7.91
	Lot de validation 2: 8.22	
R132C Mut	Lot de validation 1: 8.04	8.04
	Lot de validation 2: 8.20	
R172 Mut	Lot de validation 1: 7.74	7.59
	Lot de validation 2: 7.59	
R172K Mut	Lot de validation 1: 9.93	9.93
	Lot de validation 2: 10.58	
R100 Mut	Lot de validation 1: 6.52	5.17
	Lot de validation 2: 5.19	

Limite de détection (LoD)

La limite de détection (LoD ou sensibilité analytique) a été déterminée à partir de la « méthode de profil de précision » décrite dans les directives du CLSI/ NCCLS EP17-A (14). Cinq échantillons faiblement positifs (ADN plasmidique enrichi dans un ADN de type sauvage de gliome) ont été utilisés par mutation (30 à 110 mesures par type de mutation et par pourcentage de mutation).

Les résultats de la LoD sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16. Limite de détection (LoD)

Test	Mutations	LoD	Seuil du test	Sensibilité (%)
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

Test	Mutations	LoD	Seuil du test	Sensibilité (%)
	R172M	6.66		3.31
	R172S	6.42		14.93
	R172W	6.68		2.36
R100 Mut	R100Q	4.65	4.65	3.45

Une mutation est détectée si ΔC_T est inférieur ou égal à la LoD.

Effet de l'entrée d'ADN

L'ADN a été extrait de 4 échantillons tumoraux de gliomes différents : 2 avec *IDH1/2* de type sauvage et 2 portant la mutation *IDH1* R132H (395G>A).

Trois quantités différentes d'ADN (dont celle recommandée pour le protocole) ont été testées pour évaluer l'impact de l'entrée d'ADN sur les résultats qualitatifs. Les résultats ont montré que l'entrée d'ADN n'avait aucun impact sur les résultats qualitatifs. Toutefois, des erreurs d'ordre plus technique (erreurs de CQ de $C_{T \text{ Total}}$) ont été observées pour une entrée d'ADN inférieure à l'entrée recommandée (< 25 ng d'ADN). Par conséquent, une entrée de 25 ng d'ADN dans un volume de 5 μ l est recommandée pour effectuer le test.

Répétabilité et reproductibilité

L'étude de précision a été réalisée sur 4 échantillons différents (ADN plasmidique enrichi d'ADN de type sauvage de gliome représentatif du type sauvage (WT), échantillon mutant et échantillon seuil) testés 40 fois en duplicats (n = 80 mesures).

Les écarts-types (É.T.) et coefficients de variation (CV) sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17. Résultats de l'étude de précision

Test	Échantillon	Moyenne	É.T. _R *	É.T. _{Run} †	É.T. _{Total} ‡	CV _{Total} (%)‡	Capacité de lecture
		ΔC _T					
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 : répétabilité.

† Run : reproductibilité inter-analyse.

‡ Total : précision totale (inter-instruments, inter-opérateurs et inter-lots).

Suite du tableau sur la page suivante

Tableau 17. Résultats de l'étude de précision (suite)

Test	Échantillon	Moyenne		É.T.R.*	É.T.Run†	É.T.Total‡	CV ^{Total} (%)‡	Capacité de lecture
		ΔC_T						
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 : répétabilité.

† Run : reproductibilité inter-analyse.

‡ Total : précision totale (inter-instruments, inter-opérateurs et inter-lots).

Suite du tableau sur la page suivante

Tableau 17. Résultats de l'étude de précision (suite)

Test	Échantillon	Moyenne	É.T. _R [*]	É.T. _{Run} [†]	É.T. _{Total} [‡]	CV _{Total} (%) [‡]	Capacité de lecture
		ΔC _T					
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 : répétabilité.

† Run : reproductibilité inter-analyse.

‡ Total : précision totale (inter-instruments, inter-opérateurs et inter-lots).

Comparaison des méthodes

Comparaison avec l'immunohistochimie (IHC) pour la détection d'*IDH1/R132H*.

Une étude a été menée pour démontrer la concordance entre l'évaluation de l'état mutationnel par le kit *therascreen IDH1/2 RGQ PCR* et par l'IHC (clone H09 de l'anticorps anti-humain *IDH1R132H*, DIANOVA).

Un total de 103 échantillons cliniques de gliomes ont été sélectionnés. Le bloc le plus ancien avait 10 ans.

Tous les échantillons ont passé avec succès les contrôles de qualité pour le kit *therascreen IDH1/2 RGQ PCR* et l'IHC.

Les résultats ont indiqué une concordance positive en pourcentage de 100 %, une concordance négative en pourcentage de 98 % et une concordance globale de 99 % (tableau 18).

Tableau 18. Analyse de la concordance entre le kit *therascreen* RGQ PCR et l'IHC

Mesure de la concordance	Fréquence (%)	Intervalle de confiance de 95 %
Conc. pos. en pourcentage	45/45 (100%)	[92;100]
Conc. nég. en pourcentage	57/58 (98%)	[91;100]
Conc. globale	102/103 (99%)	[96;100]

Comparaison avec le séquençage bidirectionnel

Une étude a été menée pour démontrer la concordance entre l'évaluation de l'état mutationnel par le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR et par le séquençage bidirectionnel.

Un total de 103 échantillons cliniques tumoraux de patients atteints de gliomes ont été sélectionnés. Le bloc le plus ancien avait 10 ans.

Ces 103 échantillons ont passé les contrôles qualité avec succès pour le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR, et 101 échantillons ont présenté des résultats pour le séquençage bidirectionnel.

Les résultats ont indiqué une concordance positive en pourcentage de 100 %, une concordance négative en pourcentage de 92 % et une concordance globale de 96 % (tableaux 19 et 20).

Table 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit vs. bidirectional sequencing

		Séquençage bidirectionnel Sanger				Type sauvage
		R132*	R132C	R132H	R172†	
Kit <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172†	0	0	0	0	1
	Type sauvage	0	0	0	0	47

* R132 signifie qu'une mutation a été détectée pour R132 mais qu'il ne s'agit ni de R132H ni de R132C.

† R172 signifie qu'une mutation a été détectée pour R172 mais qu'il ne s'agit pas de R172K.

Tableau 20. Analyse de la concordance avec le séquençage bidirectionnel

Mesure de la concordance	Fréquence (%)	Intervalle de confiance de 95 %
Conc. pos. en pourcentage	50/50 (100%)	[93;100]
Conc. nég. en pourcentage	47/51 (92%)	[81;97]
Conc. globale	97/101 (96%)	[90;98]

Références

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).

Symboles

Le tableau suivant décrit les symboles pouvant figurer sur les étiquettes ou dans ce document.



<N>

Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Numéro de référence



Numéro de lot



Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)



Composants (c.-à-d. liste des éléments inclus)



Contient (contenu)



Quantité (flacons, tubes)

Rn

R indique qu'il s'agit d'une révision du manuel et n indique le numéro de révision



Code article international (GTIN)



Limite de température



Fabricant



Consulter les instructions d'utilisation



Avertissement

Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	Pour 20 réactions : 9 mélanges sonde et amorces, contrôle de type sauvage, contrôle positif, master mix, eau sans nucléase	873011
Rotor-Gene Q MDx et accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Instrument de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre comprises, installation et formation non comprises	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour préparation de réaction manuelle avec pipette à canal unique dans des tubes de 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 barrettes de 4 tubes et capuchons pour 1 000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 barrettes de 4 tubes et capuchons pour 10 000 réactions	981106
Kit QIAamp DNA FFPE Tissue – pour la purification d'ADN génomique des tissus inclus en paraffine		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Pour 50 préparations d'ADN :	56404

Produit	Contenu	N° réf.
(50)	50 colonnes QIAamp MinElute®, protéinase K, tampons, tubes de prélèvement (2 ml)	
QIASymphony DSP DNA Mini Kit – pour la purification automatisée d’ADN de 1 à 96 échantillons		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Pour 192 préparations de 200 µl chacune : comprend 2 cartouches de réactifs ainsi que des supports d’enzymes et des accessoires	937236
QIASymphony SP et accessoires		
QIASymphony SP System	Module de préparation des échantillons du système QIASymphony : installation et formation comprises, garantie d’un an, pièces et main d’œuvre	9001751
QIASymphony SP	Module de préparation des échantillons du système QIASymphony : inclut une garantie d’un an, pièces et main d’œuvre	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Cartouches de préparation d’échantillons à 8 puits pour une utilisation avec le système QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Manchons pour 8 barreaux pour une utilisation avec le système QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Embouts à filtre jetables, en portoirs (8 x 128), pour une utilisation avec le QIAcube et les instruments QIASymphony SP/AS	990332

Produit	Contenu	N° réf.
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Embouts à filtre jetables, en portoirs (8 x 128), pour une utilisation avec les instruments QIA Symphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Module de préparation des échantillons du système QIA Symphony : installation et formation comprises, garantie d'un an, pièces et main d'œuvre	19588
Réactifs		
RNase A (17 500 U)	2,5 ml (100 mg/ml ; 7 000 unités/ml, solution)	19101
Buffer ATL (200 ml)	Tampon de lyse de tissu de 200 ml pour 1 000 préparations	19076

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Ce kit est destiné au diagnostic in vitro. Les produits QIAGEN ne peuvent être revendus, modifiés pour la revente ou utilisés pour fabriquer d'autres produits commerciaux sans l'autorisation écrite de QIAGEN.

Les informations contenues dans ce document peuvent être modifiées sans préavis. QIAGEN décline toute responsabilité pour toute éventuelle erreur apparaissant dans ce document. Ce document est considéré comme complet et exact au moment de sa publication. QIAGEN ne pourra en aucun cas être tenu responsable de dommages accessoires, particuliers, multiples ou consécutifs en relation avec, ou découlant de, l'utilisation de ce document.

Les spécifications présentées par les produits QIAGEN sont garanties. La seule obligation de QIAGEN ainsi que le seul recours de tout client sont limités au remplacement sans frais des produits dans le cas où ces derniers ne correspondent pas aux performances garanties.

L'achat de ce produit permet à l'acquéreur de l'utiliser afin d'effectuer des diagnostics *in vitro* humains. Aucun brevet général ni licence d'aucune sorte autre que ce droit spécifique d'utilisation à l'achat n'est accordé par la présente.

Les mutations *IDH1/2* et leurs applications sont protégées par des brevets dont les demandes de brevet européen EP2326735 et EP2546365, les demandes de brevet américain US2011229479 et US2012202207 et leurs équivalents étrangers.

L'achat de ce produit ne confère aucun droit pour son utilisation dans le cadre d'essais cliniques pour des thérapies ciblant ou utilisant *IDH1/2*. QIAGEN développe des programmes de licences spécifiques pour ce type d'utilisation. Contacter notre département Licences et Propriété Intellectuelle à l'adresse suivante : idllicences@qiagen.com.

Marques déposées : QIAGEN®, QIAamp®, QIAasymphony®, MinElute®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (groupe QIAGEN) ; FAM™ (Life Technologies Corporation); Histolemon™ (Carlo Erba), Sarstedt® (Sarstedt AG).

Accord de licence limitée pour le kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir www.qiagen.com.
HB-1566-004 1075247 154034217 08/2016

© 2013–2016 QIAGEN, tous droits réservés.

