

Agosto 2016

Manual de uso del kit *therascreen*[®] IDH1 /2 RGQ PCR



Versión 1

Para la detección de 12 mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* en gliomas

IVD

Para uso de diagnóstico in vitro

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

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R4 **MAT**

1075247ES

Sample to Insight



Contenido

| | |
|--|----|
| Uso previsto | 4 |
| Resumen y explicación | 4 |
| Principio del procedimiento | 6 |
| Materiales suministrados | 9 |
| Contenido del kit..... | 9 |
| Materiales requeridos pero no suministrados | 11 |
| Advertencias y precauciones..... | 13 |
| Información de seguridad..... | 13 |
| Precauciones generales..... | 13 |
| Almacenamiento y manipulación de reactivos..... | 15 |
| Condiciones de envío | 15 |
| Almacenamiento | 15 |
| Estabilidad | 15 |
| Manipulación y almacenamiento de muestras | 15 |
| Procedimiento | 17 |
| Extracción y preparación del ADN..... | 17 |
| Protocolo: Detección de mutaciones en <i>IDH1/2</i> | 21 |
| Interpretación de los resultados | 27 |
| Controles de agua..... | 27 |
| Control de calidad mediante los valores de C_T de los controles..... | 27 |
| Validación de la introducción de muestras | 30 |
| Resultados de las muestras | 30 |

| | |
|--|----|
| Guía de resolución de problemas..... | 36 |
| Control de calidad..... | 40 |
| Limitaciones | 40 |
| Características de rendimiento | 42 |
| Límite de blanco (LOB) | 42 |
| Límite de detección (LOD)..... | 43 |
| Efecto de la introducción de ADN | 44 |
| Repetibilidad y reproducibilidad | 44 |
| Comparación de métodos | 47 |
| Referencias | 50 |
| Símbolos | 52 |
| Información para pedidos..... | 54 |

Uso previsto

El kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR es una prueba de diagnóstico in vitro basada en la tecnología PCR diseñada para la detección cualitativa de 7 mutaciones del gen *IDH1* y 5 mutaciones del gen *IDH2*, así como para la identificación directa de las 3 principales mutaciones en el ADN extraído de tejido cerebral humano fijado con formalina e impregnado en parafina (FFPE).

El kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR se ha diseñado para servir de ayuda en la clasificación de los gliomas.

Resumen y explicación

Las mutaciones en los genes de la isocitrato dehidrogenasa (IDH), *IDH1* e *IDH2*, aparecen con frecuencia en los gliomas de grado II y grado III clasificados por la Organización mundial de la salud (OMS) y los glioblastomas secundarios de grado IV según la OMS (GBM). Además de su valor diagnóstico, la presencia de mutaciones en los genes *IDH1/2* está asociado con el pronóstico positivo de pacientes con glioma (1-13).

El kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR es un ensayo para la detección de 12 mutaciones específicas en los genes *IDH1/2*: 6 en el codón 132 del gen *IDH1*, 5 en el codón 172 homólogo del gen *IDH2* y una en el codón 100 del gen *IDH1* (tabla 1). El kit también permite la identificación directa de las principales mutaciones de los genes *IDH1* y *IDH2* que provocan las sustituciones *IDH1* R132H, *IDH1* R132C e *IDH2* R172K.

Tabla 1. Mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* detectadas con el kit *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR

| Gen | Mutación | Cambio de base | ID de 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 |

* Se utilizan los identificadores (ID) COSMIC del catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (*Catalog of Somatic Mutations in Cancer*, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Principio del procedimiento

El kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR proporciona los reactivos necesarios para realizar 9 series distintas de reacciones de amplificación para la detección de 12 mutaciones (tabla 1):

- 3 reacciones para la amplificación total de los codones 132 y 100 del gen IDH1 y del codón 172 del gen IDH2
- 3 reacciones para la amplificación de mutaciones en los codones 132 y 100 del gen IDH1 y en el codón 172 del gen IDH2
- 3 reacciones para la amplificación de las mutaciones específicas IDH1 R132H, IDH1 R132C e IDH2 R172K

Mezclas de reacción para amplificación total

Las mezclas de primers y sondas para la amplificación total (PPM-Total) utilizan primers y sondas para amplificar las secuencias objetivo mutadas y nativas (ilustración 1).

Mezclas de reacción para la detección de mutaciones

Las mezclas de primers y sondas para la detección de mutaciones combinan primers y sondas con el objetivo de amplificar secuencias objetivo tanto mutadas como nativas con un grupo de fosfatos unidos al terminal 3' del oligonucleótido con el fin de evitar la elongación (abrazadera de PCR), específica de la secuencia objetivo nativa.

Cuando el molde de PCR contiene la secuencia nativa, el grupo de fosfatos unidos al terminal 3' del oligonucleótido domina la unión con el primer para PCR debido a su mayor afinidad. En este caso, no se produce extensión de la ADN polimerasa, o es muy baja, ni tampoco se observa amplificación, o es muy baja.

Cuando existe una secuencia mutada, es la unión del primer para PCR la que prevalece sobre la unión del grupo de fosfatos en el terminal 3' del oligonucleótido y entonces sí tiene lugar la amplificación (ilustración 1).

Mezclas de reacción para la identificación de mutaciones

La amplificación específica de alelos se lleva a cabo mediante la tecnología ARMS (sistema de mutación refractario a la amplificación), que utiliza la ADN polimerasa para diferenciar entre una coincidencia y un error de coincidencia en el extremo 3' de un primer de PCR.

Cuando la coincidencia con el primer para PCR es completa, la amplificación se produce con total eficacia. Cuando no hay coincidencia con la base 3', únicamente tiene lugar una amplificación de fondo de bajo nivel (ilustración 1).

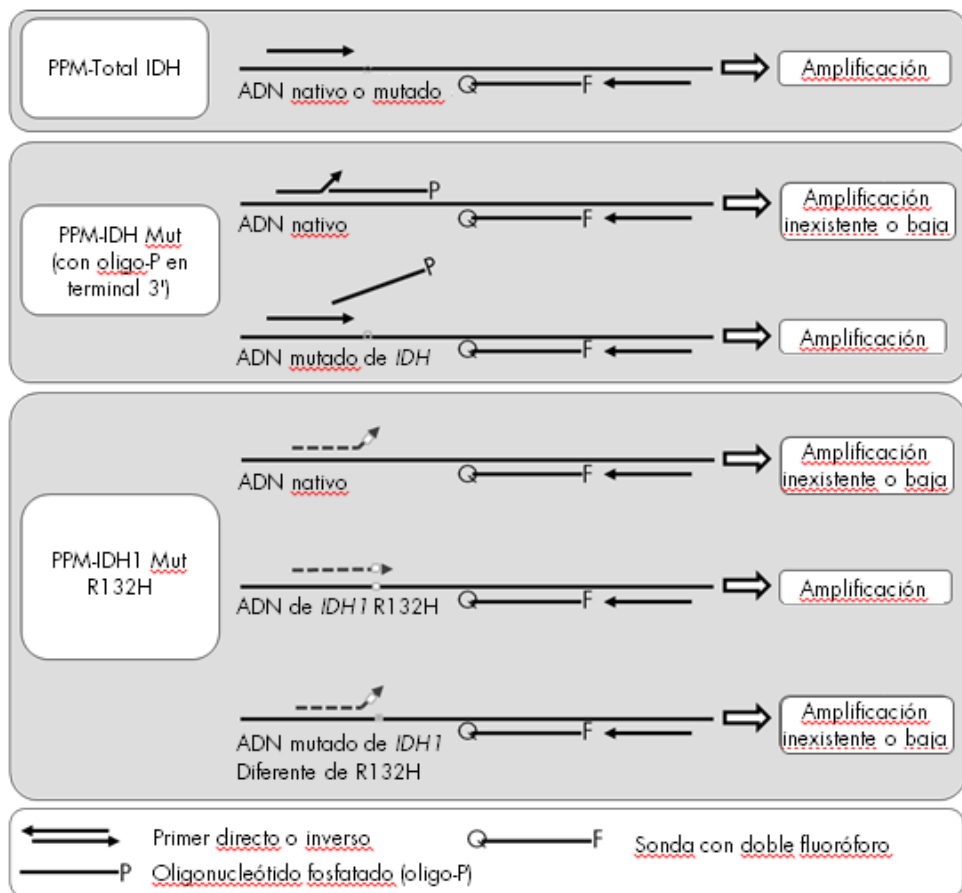


Ilustración 1. Resultados obtenidos con las mezclas de primers y sondas del kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR. Para la detección de *IDH1* R132C e *IDH2* R172K se aplica el mismo principio indicado que para *IDH1* R132H.

Materiales suministrados

Contenido del kit

| <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit | | (20) |
|---|--|---------------|
| N.º de referencia | | 873011 |
| Número de reacciones | | 20 |
| Mezcla de primers y sondas para la detección total de <i>IDH1/R132</i> (nativo y mutado) | PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x | 40 µl |
| Mezcla de primers y sondas para la detección total de <i>IDH2/R172</i> (nativo y mutado) | PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x | 40 µl |
| Mezcla de primers y sondas para la detección total de <i>IDH1/R100</i> (nativo y mutado) | PPM-Total <i>IDH1/R100</i> 25x | 40 µl |
| Mezcla de primers y sondas (incluido oligo-P) para la detección de mutaciones de <i>IDH1/R132</i> | PPM- <i>IDH1/R132</i> Mut 25x | 40 µl |
| Mezcla de primers y sondas (incluido oligo-P) para la detección de mutaciones de <i>IDH2/R172</i> | PPM- <i>IDH2/R172</i> Mut 25x | 40 µl |
| Mezcla de primers y sondas (incluido oligo-P) para la detección de mutaciones de <i>IDH1/R100</i> | PPM- <i>IDH1/R100</i> Mut 25x | 40 µl |
| Mezcla de primers y sondas para la identificación de la mutación <i>IDH1 R132H</i> | PPM- <i>IDH1</i> Mut <i>R132H</i> 25x | 40 µl |

La tabla continúa en la página siguiente.

Contenido del kit (continuación)

| | | |
|--|---|---------------|
| <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit | | (20) |
| N.º de referencia | | 873011 |
| Número de reacciones | | 20 |
| Mezcla de primers y sondas para la identificación de la mutación <i>IDH1</i> R132C | PPM-IDH1 Mut R132C 25x | 40 µl |
| Mezcla de primers y sondas para la identificación de la mutación <i>IDH2</i> R172K | PPM-IDH2 Mut R172K 25x | 40 µl |
| ADN genómico nativo de <i>IDH1/IDH2</i> | Control nativo (WT) para <i>IDH1/IDH2</i> | 270 µl |
| Control positivo de mutaciones en <i>IDH1/IDH2</i> | Control positivo para <i>IDH1/IDH2</i> | 270 µl |
| Mezcla de polimerasa <i>Taq</i> ADN, dNTP, MgCl ₂ y tampón para qPCR | Mezcla maestra para qPCR 2x | 5 x 900 µl |
| Agua exenta de nucleasas | Agua exenta de nucleasas | 5 x 525 µl |
| <i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit Handbook</i> (inglés) | | 1 |

Materiales requeridos pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre seguridad (SDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

Importante: compruebe que los equipos utilizados en este procedimiento se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

Reactivos (extracción manual de ADN)

- Kit para extracción de ADN: kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (n.º de referencia 56404)
- RNasa A (17.500 U) (n.º de referencia 19101)
- Xileno o Histolemon™ (Carlo Erba, n.º de referencia 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96-100%)
- 1x tampón TE, pH 8,0

Reactivos (extracción automática de ADN)

- Kit para extracción de ADN: kit QIAasymphony® DSP DNA Mini (n.º de referencia 937236)
- Tampón ATL (n.º de referencia 19076 o 939016)
- RNasa A (n.º de referencia 19101)
- Xileno o histolemon (Carlo Erba, n.º de referencia 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96-100%)
- 1x tampón TE, pH 8,0

Consumibles adicionales para la extracción automática de ADN

- Scalpels
- Nuclease-free aerosol-resistant sterile PCR pipet tips with hydrophobic filters
- 2.0 ml or 1.5 ml nuclease-free tubes
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for the Rotor-Gene Q (cat. nos. 981103 or 981106)
- Ice

Additional consumables for automated DNA extraction

- Cartuchos para la preparación de muestras, 8 pocillos (n.º de referencia 997002)
- Tapas con 8 ruedas (n.º de referencia 997004)
- Puntas de filtro de 200 µl, Qsym SP (n.º de referencia 990332) y puntas de filtro de 1.500 µl, Qsym SP (n.º de referencia 997024)
- Microtubos de elución CL (n.º de referencia 19588)
- Microtubos de 2,0 ml tipo H (Sarstedt®, n.º de referencia 72.693, www.sarstedt.com)

Equipo

- Bandeja deslizante y 2 baños compatibles con las bandejas para xileno/histolemon y etanol
- Pipetas de microlitro específicas para PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1.000 µl)
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 0,5 ml/1,5 ml (capaz de alcanzar entre 13.000-14.000 rpm)
- Agitador vórtex de mesa
- Equipo para PCR en tiempo real*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM y material específico relacionado
- Software Rotor-Gene Q MDx, versión 2.1.0 o superior
- Biofotómetro

- Agitador calentador, incubador orbital térmico, bloque térmico o baño de agua que permita la incubación a 56 °C y 90 °C

Equipo adicional para la purificación automática

- Equipo QIASymphony SP*
- Software QIASymphony SP, versión 4.0 o superior

Advertencias y precauciones

Para uso de diagnóstico in vitro

Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre seguridad (SDS). Puede obtenerlas en línea en el formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

Para conocer la información de seguridad del kit de purificación utilizado, consulte el manual del kit correspondiente. Para conocer la información de seguridad relativa a los equipos, consulte el manual de usuario de cada instrumento.

Precauciones generales

- La prueba se ha diseñado para su uso con muestras de resección quirúrgica de tejido tumoral fijado en formalina e impregnado en parafina (FFPE).
- Todos los materiales químicos y biológicos son potencialmente peligrosos. Las muestras son material potencialmente infeccioso y deben tratarse como material biopeligroso.

- Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los procedimientos de seguridad local.
- Los reactivos del kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR ofrecen una dilución óptima. No debe realizarse una mayor dilución de los reactivos puesto que podrían perder eficacia. No utilice volúmenes de reacción (mezcla de reacción más muestra) inferiores a 25 µl.
- Todos los reactivos suministrados con el kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo kit. No sustituya ningún reactivo de los kits *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR, ya que se podría ver afectado el rendimiento.
- Consulte el manual del usuario del instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM para conocer las advertencias, las precauciones y los procedimientos adicionales.
- Un cambio en los tiempos y las temperaturas de incubación puede causar resultados erróneos o dispares.
- No utilice componentes caducados o mal almacenados.
- Las mezclas de primers y sondas podrían alterarse si se exponen a la luz.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación de las mezclas con los materiales sintéticos contenidos en el reactivo para el control positivo.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación por DNasa, que podría degradar el molde de ADN.
- Utilice pipetas individuales exclusivas para preparar las mezclas de reacción y añadir moldes.
- Lleve a cabo la preparación y dispensación de las mezclas de reacción en una área diferente de la utilizada para añadir los moldes.
- No abra el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM hasta que finalice la serie analítica.
- No abra los tubos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM hasta que finalice la serie analítica.
- Es importante controlar que las pruebas se realicen correctamente, haciendo especial hincapié en la introducción incorrecta de muestras, los errores de carga y los errores de pipeteo.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

Condiciones de envío

El kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR se suministra en hielo seco. Si alguno de los componentes del kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR no está congelado a la llegada, si el embalaje externo se ha abierto durante el transporte o si el envío no incluye la nota de embalaje, el manual o los reactivos, póngase en contacto con los departamentos del servicio técnico de QIAGEN (visite el sitio www.qiagen.com).

Almacenamiento

Tras la recepción, el kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR debe almacenarse inmediatamente en un congelador a una temperatura constante de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y protegerse de la luz.

Estabilidad

Si se almacena en las condiciones especificadas, el kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

Una vez abiertos, los reactivos deben almacenarse en el embalaje original a una temperatura comprendida entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la fecha de caducidad indicada en el embalaje. No es aconsejable descongelarlo y volver luego a congelarlo. No exceda el máximo de 5 ciclos de congelación-descongelación.

Manipulación y almacenamiento de muestras

El kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR se ha diseñado para su uso con muestras de ADN extraídas de resecciones quirúrgicas de tejido tumoral fijado en formalina e impregnado en

parafina (FFPE) obtenido de pacientes con cáncer cerebral. Todas las muestras de tejido deberían tratarse como potencialmente peligrosas.

- Las muestras de tejido deben fijarse en formalina tamponada neutra (NBF) al 4-10%.
- Deben cortarse secciones en serie de 10 µm del bloque de parafina y colocarlas en un portaobjetos de vidrio.
- Debe de ser un profesional cualificado (p. ej., un patólogo) quien valore el contenido tumoral y el área en una sección adyacente teñida con hematoxilina y eosina (H&E). Utilice secciones en serie para realizar la extracción de ADN.
- La prueba solamente se puede realizar con secciones con $\geq 40\%$ de contenido tumoral.
- Para las secciones con $< 50 \text{ mm}^2$ de área de tejido, se recomienda procesar un número suficiente de secciones para aumentar el total del área de tejido a un mínimo de 50 mm^2 (100 mm^2 para la extracción automática con el equipo QIASymphony SP).
- Etiquete, manipule y almacene las muestras tumorales, bloques, portaobjetos y muestras listos para la extracción de una forma controlada según los procedimientos locales.
- Conserve los bloques FFPE y portaobjetos a temperatura ambiente. Los portaobjetos pueden guardarse a temperatura ambiente hasta 4 semanas antes de la extracción de ADN para su uso con el kit theascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- Después de la extracción, el ADN genómico puede almacenarse un máximo de 1 semana a 2-8 °C o 8 semanas a una temperatura comprendida entre -15 y -25 °C.

Procedimiento

Extracción y preparación del ADN

Utilice el kit QIAamp DNA FFPE Tissue (n.º de referencia 56404) o el kit QIASymphony DSP DNA Mini (n.º de referencia 937236) para purificar el ADN genómico de las muestras preparadas a partir de muestras de tumores cerebrales FFPE.

Nota: el kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR solamente se ha validado para su uso con los kits QIAamp DNA FFPE Tissue o QIASymphony DSP DNA Mini. No utilice ningún otro producto de extracción de ADN.

Utilización del kit QIAamp DNA FFPE Tissue



Lea con detenimiento las modificaciones indicadas a continuación y que deben aplicarse a la hoja de protocolo QIAamp.

- Consulte el apartado “Starting material” (Material para empezar) del documento QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook (Manual de uso del kit QIAamp DNA FFPE Tissue) y el apartado “Manipulación y almacenamiento de muestras” en la página 15 de este manual para conocer el método de preparación de las muestras antes de realizar la desparafinización y la extracción del ADN.
- El kit QIAamp DNA FFPE Tissue solamente debe utilizarse de modo manual.
- Es necesario realizar el paso de RNasa descrito en el documento QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook (Manual de uso del kit QIAamp DNA FFPE Tissue).
- No utilice la solución de desparafinización de QIAGEN. Utilice solamente el método de desparafinización con xileno/etanol, tal como se describe en el apartado “Procedimiento de desparafinización de portaobjetos con el kit QIAamp DNA FFPE

Tissue” que figura más abajo. Puede sustituir el xileno con histolemon (sustituto del xileno).

- La digestión de la proteinasa K debe realizarse durante 1 hora.
- Las muestras deben eluirse dos veces en 30 µl de tampón de elución (tampón ATE) del kit QIAamp DNA FFPE Tissue.

Procedimiento de desparafinización de portaobjetos con el kit QIAamp DNA FFPE Tissue

1. Coloque los portaobjetos en una bandeja específica para portaobjetos.
2. Introduzca la bandeja para portaobjetos en un baño para portaobjetos que contenga xileno o histolemon durante 2 minutos. Mueva la bandeja 2 o 3 veces hacia adelante y hacia atrás.
3. Sumerja la bandeja en un segundo baño para portaobjetos que contenga etanol (96-100%) durante 2 minutos. Mueva la bandeja 2 o 3 veces hacia adelante y hacia atrás.
4. Deje secar los portaobjetos a una temperatura comprendida entre 15 y 37 °C. El secado puede tardar unos minutos.
5. Etiquete los tubos para microcentrífuga de 1,5 ml para cada muestra y añada 180 µl de tampón ATL (del kit QIAamp DNA FFPE Tissue) a cada tubo.
6. Añada unas gotas de tampón ATL al corte tisular de los portaobjetos (cantidad suficiente para cubrir el tejido).
7. Raspe el área de tejido con un bisturí estéril y añada el tejido raspado al tubo para microcentrífuga etiquetado correspondiente.
8. Añada 20 µl de proteinasa K (del kit QIAamp DNA FFPE Tissue) a cada tubo y agítelo bien para mezclar el contenido.
9. Déjelo incubar a una temperatura de 56 °C durante 1 hora.

Continúe con el paso de incubación a 90 °C del protocolo del kit QIAamp DNA FFPE Tissue (paso 12 del documento *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook* (Manual de uso del kit QIAamp DNA FFPE Tissue) de junio de 2012, página 13).

Utilización del kit QIAasymphony DSP DNA Mini



Lea con detenimiento las modificaciones indicadas a continuación y que deben aplicarse a la hoja de protocolo QIAasymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.

- Consulte el apartado “Manipulación y almacenamiento de muestras”, en la página 15, para conocer el método de preparación de las muestras previo a la desparafinización y la extracción del ADN.
- Es necesario realizar el paso de RNasa descrito en la hoja de protocolo QIAasymphony SP.
- No utilice la solución de desparafinización de QIAGEN. Utilice solamente el método de desparafinización con xileno/etanol, tal como se describe en el apartado “Procedimiento de desparafinización de portaobjetos con el kit QIAasymphony DNA Mini” que figura más abajo. Puede sustituir el xileno con histolemon (sustituto del xileno).
- La digestión de la proteinasa K debe realizarse durante 1 hora.
- Seleccione un volumen de elución de 50 µl en la pantalla táctil.

Procedimiento de desparafinización de portaobjetos con el kit QIAasymphony DNA Mini

Lleve a cabo la desparafinización siguiendo los pasos que se describen a continuación, que pueden variar respecto a la hoja de protocolo QIAasymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Coloque los portaobjetos en una bandeja específica para portaobjetos.
2. Introduzca la bandeja para portaobjetos en un baño para portaobjetos que contenga xileno o histolemon durante 2 minutos. Mueva la bandeja 2 o 3 veces hacia adelante y hacia atrás.
3. Sumerja la bandeja en un segundo baño para portaobjetos que contenga etanol (96-100%) durante 2 minutos. Mueva la bandeja 2 o 3 veces hacia adelante y hacia atrás.

4. Deje secar los portaobjetos a una temperatura comprendida entre 15 y 37 °C. El secado puede tardar unos minutos.
5. Etiquete los tubos para microcentrífuga de 1,5 ml para cada muestra y añada 220 µl de tampón ATL a cada tubo.
6. Añada unas gotas de tampón ATL al corte tisular de los portaobjetos (cantidad suficiente para cubrir el tejido).
7. Raspe el área de tejido con un bisturí estéril y añada el tejido raspado al tubo para microcentrífuga etiquetado correspondiente.
8. Añada 20 µl de proteinasa K (del kit QIAamp DNA FFPE Tissue) a cada tubo y agítelo bien para mezclar el contenido.

Continúe con el paso de incubación a 56 °C de la hoja de protocolo QIAasymphony SP: Protocolo Tissue_IC_200_V7_DSP (paso 12 del protocolo "Deparaffinization using xylene" para la desparafinización con xileno de abril de 2012). Déjelo incubar a una temperatura de 56 °C durante 1 hora.

ADN genómico

El ADN genómico puede conservarse a 2-8 °C durante 1 semana con posterioridad a su extracción o 8 semanas a una temperatura comprendida entre -15 y -25 °C..

La cantidad de ADN se determina mediante la densidad óptica (DO) de la muestra a 260 nm.

Diluya el ADN hasta obtener una concentración de 5 ng/µl en 1x de tampón TE a pH 8,0.

La reacción de PCR está optimizada para muestras con 25 ng de ADN genómico purificado.

Protocolo: Detección de mutaciones en *IDH1/2*

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Para optimizar el kit theascreen *IDH1/2* RGQ PCR, es preciso agrupar las muestras en lotes de 4. Un tamaño de lote inferior implica una capacidad de análisis de muestras inferior con el kit theascreen *IDH1/2* RGQ PCR.
- Se recomienda analizar todas las muestras a la vez en cada serie de PCR, como se indica en la tabla 2 y con el bloque de cargo y la configuración del rotor indicados en Tabla 3 e Ilustración 2 respectivamente.

Tabla 2. Número de reacciones para los equipos Rotor-Gene Q MDx con un rotor de 72 tubos

| Muestras | Reacciones |
|--------------------|--|
| n muestras de ADN | n x 1 reacciones |
| 2 controles de ADN | 2 reacciones: controles positivo y nativo, analizado cada uno una vez en cada serie de PCR |
| Control de agua | 1 reacción |

Tabla 3. Bloque de carga recomendado para un experimento con el kit *therascreen* IDH1/2 RGQ

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

* PC: control positivo

† WTC: control nativo

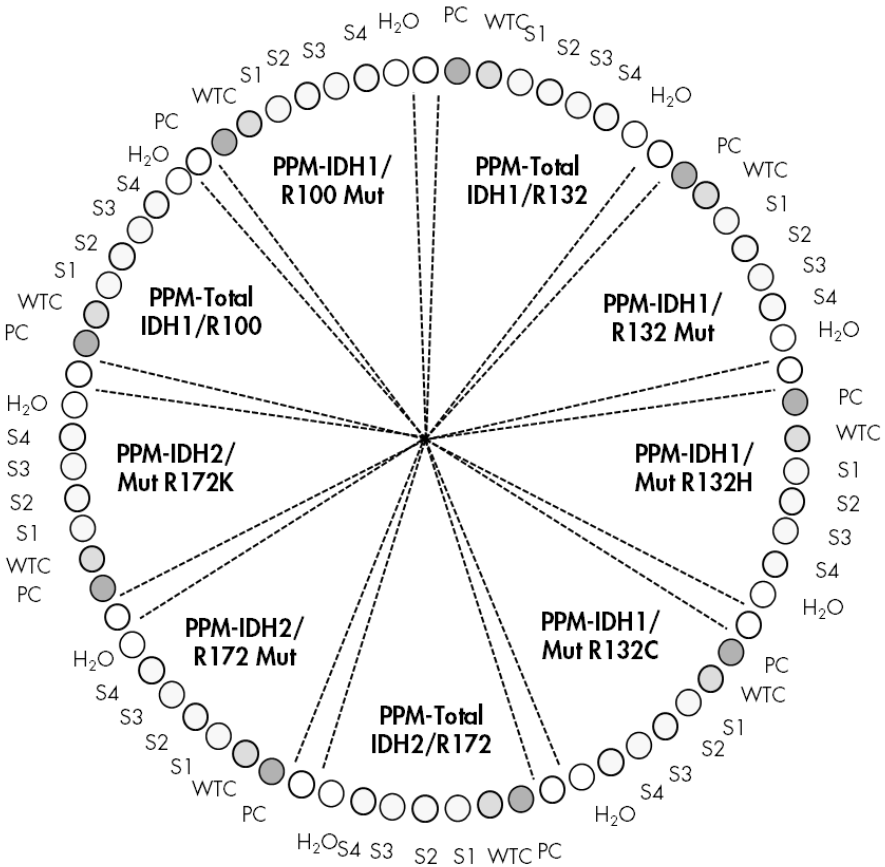


Ilustración 2. Configuración del rotor recomendada para un experimento con el kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR

Nota: asegúrese de colocar siempre una muestra en la posición 1 del rotor. De lo contrario, el equipo no se calibrará y se obtendrán datos de fluorescencia incorrectos.

Procedimiento

1. Descongele todos los componentes necesarios y colóquelos en hielo.
2. Prepare las siguientes mezclas de PCR según el número de muestras que vayan a procesarse.

Todas las concentraciones se refieren al volumen final de la reacción.

En la tabla 4 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculada para lograr un volumen de reacción final de 25 μ l. Puede prepararse una premezcla para cada PPM de acuerdo con el número de reacciones. Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 4. Preparación de las mezclas de PCR

| Componente | Premezcla:* | | |
|---|-----------------------|-----------------------------|---------------------|
| | 1 reacción (μ l) | 7 + 1 reacciones (μ l) | Concentración final |
| Mezcla maestra para qPCR, 2x | 12.5 | 100 | 1x |
| PPM*, 25x | 1 | 8 | 1x |
| Agua exenta de nucleasas | 6.5 | 52 | – |
| Muestra o control† (añadir en el paso 4) | 5 | 5 en cada una | – |
| Volumen total | 25 | 25 en cada una | – |

* Prepare 9 premezclas, una con cada una de las PPM suministradas con el kit.

† Control positivo, control negativo o control de agua

3. Dispense 20 μ l de la solución de premezcla en cada tubo de Rotor-Gene (Tabla 3.).
4. Añada 5 μ l del material que debe cuantificarse (25 ng de ADN genómico de muestra o control) en el tubo correspondiente (volumen total: 25 μ l; Tabla 3.).
5. Mezcle suavemente pipeteando arriba y abajo.
6. Coloque los tubos en el adaptador suministrado con el equipo (Ilustración 2). Coloque tubos vacíos en las posiciones no ocupadas.

7. Cargue el adaptador lleno en el equipo Rotor-Gene Q MDx.
8. Programe el equipo Rotor-Gene Q MDx mediante el programa de ciclado tal como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Perfil de temperatura

| | |
|------------------------|--|
| "Hold" (Pausa) | Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 min |
| "Cycling" (Ciclado) | 40 repeticiones 95 °C durante 15 s 60 °C durante 60 s con adquisición de fluorescencia FAM™ en el canal verde: "Single" (único) |

9. de diálogo "**New Run Wizard**" (Asistente para series nuevas) para abrir el cuadro de diálogo "**Auto-Gain Optimisation Setup**" (Configuración de la optimización de ganancia automática). Defina el rango para el canal verde entre 2Fl para "**Min Reading**" (Lectura mínima) y 10Fl para "**Max Reading**" (Lectura máxima).
10. Marque la casilla "**Perform Optimisation Before 1st Acquisition**" (Ejecutar la optimización antes de la primera adquisición) y cierre el cuadro de diálogo "**Auto-Gain Optimisation Setup**" (Configuración de la optimización de ganancia automática).
11. Inicie el programa de termociclado.
12. Cuando termine el termociclado, realice estos pasos.
 - Seleccione "**Options**" (Opciones) y luego "**Crop Start Cycles**" (Borrar ciclos de inicio). Elimine los datos anteriores al ciclo 10 para descartar cualquier artefacto.
 - Seleccione "**Analysis**" (Análisis) y "**Cycling A. Green from 10**" (Ciclado A. Verde a partir de 10), indicado en el informe como "left threshold = 10.00" (umbral izquierdo = 10,00).
 - Seleccione "**Dynamic Tube**" (Tubo dinámico) como método de normalización y "**Slope Correct**" (Pendiente correcta) para corregir el ruido de la pendiente.
 - Defina el valor para "**Outlier Removal**" (Eliminación de valores atípicos) en 0% (que corresponde al umbral de NTC).

-
- Desactive la opción "**Reaction Efficiency Threshold**" (Umbral de eficiencia de la reacción).
 - Defina el umbral en **0,03**.
 - Active la escala lineal del gráfico.
 - Seleccione "**Digital Filter: Light**" (Filtro digital: luz).

Interpretación de los resultados

Controles de agua

Los controles de agua (controles sin molde) deberían generar valores de C_T iguales a cero para todas las mezclas de primers y sondas.

La obtención de un valor de C_T positivo indica que se ha producido contaminación cruzada. Consulte el apartado “Guía de resolución de problemas”, en la página 36, para encontrar una solución.

Control de calidad mediante los valores de C_T de los controles

El control nativo (WTC) para *IDH1/2* y el control positivo para mutaciones de *IDH1/2* (Mut-PC) permiten llevar a cabo la cualificación de un experimento.

Para cada control, calcule los valores de ΔC_T como se indica a continuación.

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

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

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

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

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

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

Si se obtiene un valor de C_T de 0, utilice un valor de C_T de 40 para calcular el valor de ΔC_T .

Los controles se clasifican como positivos para la mutación si los valores de ΔC_T son menores o iguales que los valores de corte de ΔC_T respectivos, que se indican en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de corte para cada ensayo de mutación

| Ensayo de mutación | Valor de corte (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 |

- El control nativo para IDH1/2 debe detectarse como negativo para la mutación en cada ensayo de mutación (Tabla 7).
- El control positivo para IDH1/2 debe detectarse como positivo para la mutación en cada ensayo de mutación (Tabla 7).

El experimento completo se rechaza cuando no se cumple ninguna de las condiciones.

Tabla 7. Ejemplo de validación de la serie a partir de los controles

| | Agua (NTC) | Control nativo (WT) para IDH1/IDH2 | Control positivo para IDH1/IDH2 |
|-----------------------------|-------------------|---|--|
| C_T Total IDH1/R132 | No detectado | 25.45 | 23.95 |
| C_T IDH1/R132 Mut | No detectado | 34.32 | 25.76 |
| ΔC_T IDH1/R132 Mut | No detectado | 8.87 | 1.81 |
| C_T Total IDH2/R172 | No detectado | 25.42 | 24.93 |
| C_T IDH2/R172 Mut | No detectado | 34.36 | 26.36 |
| ΔC_T IDH2/R172 Mut | No detectado | 8.94 | 1.43 |
| C_T Total IDH1/R100 | No detectado | 26.30 | 24.69 |
| C_T IDH1/R100 Mut | No detectado | 33.04 | 26.39 |
| ΔC_T IDH1/R100 Mut | No detectado | 6.74 | 1.70 |
| C_T IDH1 Mut R132H | No detectado | 35.20 | 26.48 |
| ΔC_T IDH1 Mut R132H | No detectado | 9.75 | 2.53 |
| C_T IDH1 Mut R132C | No detectado | 37.16 | 27.07 |
| ΔC_T IDH1 Mut R132C | No detectado | 11.71 | 3.12 |
| C_T IDH2 Mut R172K | No detectado | 40.00 | 27.97 |
| ΔC_T IDH2 Mut R172K | No detectado | 14.58 | 3.04 |

Validación de la introducción de muestras

Es necesario validar la introducción de las muestras antes de proceder a la interpretación.

El valor de C_T obtenido para una muestra con cada PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ y $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) debe ser inferior a 32,00. Los valores de $C_{T \text{ Total}} \geq 32,00$ se deben a un ADN de poca calidad. En estos casos es necesario volver a analizar la muestra. Si la cantidad de ADN sigue siendo insuficiente, extraiga más tejido tumoral si es posible (consulte el apartado "Guía de resolución de problemas" en la página 36).

Resultados de las muestras

Detección de mutaciones de *IDH1/2*

Calcule para cada muestra los valores de ΔC_T obtenidos con cada ensayo para la detección de mutaciones (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut), tal como se indica a continuación.

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

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

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

Si se obtiene un valor de C_T de 0, utilice un valor de C_T de 40 para calcular el valor de ΔC_T .

Las muestras se clasifican como positivas para la mutación si el valor de ΔC_T es menor o igual que el valor de corte de ΔC_T del ensayo respectivo para la detección de mutación, indicados en la tabla 8.

Tabla 8. Valores de corte para cada ensayo para la detección de mutaciones

| Ensayo de mutación | Valor de corte (ΔC_T) |
|--------------------|---------------------------------|
| IDH1/R132 Mut | 5.34 |
| IDH2/R172 Mut | 6.42 |
| IDH1/R100 Mut | 4.65 |

Identificación de mutaciones de *IDH1/2*

Calcule para cada muestra los valores de ΔC_T obtenidos con cada ensayo para la identificación de mutaciones (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K), tal como se indica a continuación.

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

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

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

Si se obtiene un valor de C_T de 0, utilice un valor de C_T de 40 para calcular el valor de ΔC_T .

La mutación de la muestra se identifica cuando el valor de ΔC_T es menor o igual que el valor de corte de ΔC_T del ensayo respectivo para la identificación de mutaciones, indicados en la tabla 9. Ejemplos de interpretaciones de ΔC_T están indicados en las Tablas 10 y 11.

Tabla 9. Valores de corte para cada ensayo para la identificación de mutaciones

| Ensayo de mutación | Valor de corte (ΔC_T) |
|--------------------|---------------------------------|
| IDH1 Mut R132H | 6.87 |
| IDH1 Mut R132C | 7.14 |

| Ensayo de mutación | Valor de corte (ΔC_T) |
|--------------------|---------------------------------|
| IDH2 Mut R172K | 8.49 |

Tabla 10. Ejemplo de detección de mutaciones de IDH1/2

| Valor | Muestra 1 | Muestra 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 |
| Mutación detectada | Mutación no detectada | Mutación R132 detectada |

Tabla 11. Ejemplo de identificación de mutaciones de IDH1/2

| Value | Sample 1 | Sample 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 |
| Mutación identificada | Mutación no detectada | Detección de la mutación R132H |

Interpretación de las mutaciones de *IDH1/2*

En la tabla 12 se muestra el procedimiento utilizado para asignar el tipo de mutación de *IDH1/2* a las muestras que han resultado positivas para una mutación de *IDH1/2*. En la tabla 13 encontrará un ejemplo de interpretación.

Tabla 12. Guía de interpretación

| | | Mutación identificada | | | |
|---------------------------|--------------------------------|---|---|--|---------------------------------------|
| | | <i>IDH1</i> Mut R132H detectada | <i>IDH1</i> Mut R132C detectada | <i>IDH2</i> Mut R172K detectada | Mutación no detectada |
| Mutación detectada | Mutación R132 detectada | Mutación R132H detectada | Mutación R132C detectada | – | Mutación R132, pero no R132H ni R132C |
| | Mutación R172 detectada | – | – | Mutación R172K detectada | Mutación R172, pero no R172K |
| | Mutación R100 detectada | – | – | – | R100 |
| | Mutación no detectada | Bajo contenido de mutación R132H detectada (entre un 1% y un 2%)* | Bajo contenido de mutación R132C detectada (entre un 1% y un 4%)* | Bajo contenido de mutación R172K detectada (aproximadamente 1%)* | Mutación no detectada |

* Estos casos son excepcionales y es necesario revisar todas las muestras y criterios de aceptación técnicos, especialmente el contenido de células tumorales. Si se cumplen todos los criterios, es preciso volver a analizar la muestra.

Tabla 13. Ejemplo de informe e interpretación de las mutaciones de *IDH1/2*

| | Muestra 1 | Muestra 2 |
|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Mutación detectada | Mutación no detectada | Mutación R132 detectada |
| Mutación identificada | Mutación no detectada | Detección de la mutación R132H |
| Interpretación del resultado | Mutación no detectada ni identificada | Mutación R132H |

Nota: cuando para una muestra se obtienen 2 o más valores ΔC_T menores o iguales que los valores de corte de ΔC_T , el estado de mutación se asigna a la mutación que presente una mayor diferencia entre el valor de corte y el ΔC_T . Véase el ejemplo en la tabla 14.

Tabla 14. Ejemplo de interpretación en caso de varios resultados positivos

| | Muestra 3 | Muestra 4 |
|--|------------------|------------------|
| ΔC_T <small>IDH1/R132 Mut</small> | 1.24 | 5.24 |
| ΔC_T cutoff <small>IDH1/R132 Mut</small> | 5.34 | 5.34 |
| $(\Delta C_T$ cutoff - $\Delta C_T)$ <small>IDH1/R132 Mut</small> | 4.10 | 0.10 |
| ΔC_T <small>IDH2/R172 Mut</small> | 5.32 | 5.95 |
| ΔC_T cutoff <small>IDH2/R172 Mut</small> | 6.42 | 6.42 |
| $(\Delta C_T$ cutoff - $\Delta C_T)$ <small>IDH2/R172 Mut</small> | 1.10 | 0.47 |
| Interpretación del resultado | Mutación R132 | Mutación R172 |

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, visite www.qiagen.com.

Comentarios y sugerencias

Columna taponada durante la extracción de ADN

Lisis incompleta

Repita la centrifugación.

El lisado restante se puede transferir a una columna nueva.

Repita la serie de extracción con menos tejido FFPE.

ADN insuficiente en el eluato de extracción

Área de tejido FFPE
insuficiente

Repita la serie de extracción con más secciones tisulares FFPE.

Control nativo de *IDH1/2* no detectado

a) Errores de pipeteo u omisión de reactivos; inversiones de tubo o pocillo

Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.

Repita la PCR.

b) Almacenamiento incorrecto de los componentes del kit

Almacene el kit *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantenga la mezcla de primers y sondas protegida de la luz. Consulte "Almacenamiento y manipulación de reactivos", en la página 15.

No exceda el máximo de 5 ciclos de congelación-descongelación.

Comentarios y sugerencias

- c) Kit *therascreen* IDH1/2
RGQ PCR caducado
- Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta del kit) y, si es necesario, utilice un kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR nuevo.

IDH1/2 positive control not detected

- a) Errores de pipeteo u omisión de reactivos; inversiones de tubo o pocillo
- Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.
Repita la PCR.
- b) Almacenamiento incorrecto de los componentes del kit
- Almacene el kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantenga la mezcla de primers y sondas protegida de la luz. Consulte "Almacenamiento y manipulación de reactivos", en la página 15. No exceda el máximo de 5 ciclos de congelación-descongelación.
- c) Kit *therascreen* IDH1/2
RGQ PCR caducado
- Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta del kit) y, si es necesario, utilice un kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR nuevo.

Sin señal, incluidos los controles

- a) Ningún tubo de reacción en la posición 1 del equipo Rotor-Gene Q MDx
- Asegúrese de colocar siempre una muestra en la posición 1 del rotor. De lo contrario, el equipo no se calibrará y se obtendrán datos de fluorescencia incorrectos.
- b) Errores de pipeteo u omisión de reactivos; inversiones de tubo o pocillo
- Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.
Repita la PCR.
- c) Almacenamiento
- Almacene el kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y

Comentarios y sugerencias

- | | |
|---|--|
| incorrecto de los componentes del kit | mantenga la mezcla de primers y sondas protegida de la luz. Consulte "Almacenamiento y manipulación de reactivos", en la página 15. No exceda el máximo de 5 ciclos de congelación-descongelación. |
| d) Kit <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR caducado | Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta del kit) y, si es necesario, utilice un kit <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR nuevo. |
| e) Canal de detección seleccionado incorrecto | Defina el canal de detección en Cycling Green o a 530 nm/640 nm. |
| f) No existe programa de adquisición de datos | Compruebe el programa de ciclado. Consulte la Tabla 5 en la página 25. Seleccione el modo de adquisición único (Single) al final de cada segmento de hibridación del programa de PCR. |

Variación en la intensidad de la fluorescencia

Errores de pipeteo u omisión de reactivos; inversiones de tubo o pocillo

Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.

Repita la PCR.

Intensidad de fluorescencia demasiado baja

- | | |
|---|---|
| a) Almacenamiento incorrecto de los componentes del kit | Almacene el kit <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantenga la mezcla de primers y sondas protegida de la luz. Consulte "Almacenamiento y manipulación de reactivos", en la página 15. No exceda el máximo de 5 ciclos de congelación-descongelación. |
|---|---|

Comentarios y sugerencias

- | | |
|---|---|
| b) Kit <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR caducado | Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta del kit) y, si es necesario, utilice un kit <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR nuevo. |
| c) Cantidad inicial de ADN diana demasiado baja | Verifique siempre la concentración del ADN antes de empezar. Consulte "Extracción y preparación del ADN", en la página 17. |

Control negativo (H₂O) que genera un resultado positivo

Contaminación cruzada, contaminación de reactivos, error del equipo, inversión de pocillos o capilares o degradación de la sonda

Sustituya los reactivos importantes o utilice un kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR nuevo.

Manipule siempre las muestras, los componentes del kit y los fungibles según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación por arrastre.

Mantenga las mezclas de primers y de sondas protegidas de la luz

Compruebe si se han generado falsos positivos en las curvas de fluorescencia

Revise la configuración de la reacción.

Consulte "Protocolo: Detección de *mutaciones* en IDH1/2", en la página 21.

Control de calidad

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR se analiza en cuanto a las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos. Los certificados de los análisis pueden solicitarse en www.qiagen.com/support/.

Limitaciones

Este kit se ha diseñado para uso profesional.

Solo el personal especialmente formado y cualificado en las técnicas de biología molecular y que esté familiarizado con esta tecnología puede utilizar el producto.

Este kit debe utilizarse de acuerdo con las instrucciones recogidas en este manual, junto con un equipo validado especificado en “Materiales requeridos pero no suministrados”, en la página 11.

Debe prestar especial atención a las fechas de caducidad impresas en las cajas y etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.

El kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR se ha validado únicamente con tejido cerebral fijado en formalina tamponada e impregnado en parafina.

El kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR solamente se ha validado para su uso con los kits QIAamp DNA FFPE Tissue o QIASymphony DSP DNA Mini.

Únicamente se han validado Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (para PCR) y QIASymphony SP (para la preparación de muestras).

Cualquier uso no autorizado de este producto o modificación de los componentes eximirá a QIAGEN de posibles responsabilidades.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con los procedimientos utilizados en cada laboratorio que no estén contemplados en los estudios de rendimiento de QIAGEN.

La prueba se ha diseñado para la detección de 7 mutaciones en los codones 132 y 100 del gen *IDH1* y de 5 mutaciones en el codón 172 del gen *IDH2*. Es posible que las muestras con un resultado "no mutation detected" (mutación no detectada) incluyan mutaciones de *IDH1* o *IDH2* que no se pueden detectar con este ensayo.

La detección de las mutaciones depende de la integridad de la muestra, del contenido tumoral y del volumen de ADN amplificable que contiene la muestra.

La interpretación de los resultados de diagnóstico obtenidos con el producto debe realizarse teniendo en cuenta el contexto de todos los datos clínicos y de laboratorio relevantes.

Características de rendimiento

Límite de blanco (LOB)

El límite de blanco (LOB) se ha determinado (según la directriz EP17-A del CLSI/NCCLS; 14) para las muestras negativas (tejido cerebral normal FFPE, 8 muestras, 64 mediciones/lote, 2 lotes).

Los resultados del LOB se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Límite de blanco (LOB)

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

Límite de detección (LOD)

El límite de detección (LOD o sensibilidad analítica) se ha determinado según el “enfoque de precisión” de la directriz EP17-A del CLSI/NCCLS (14). Se utilizaron cinco muestras positivas de bajo contenido (ADN plasmídico añadido a ADN nativo de glioma) por mutación (entre 30 y 110 mediciones por tipo de mutación y porcentaje de mutación).

Los resultados del LOD se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Límite de detección (LOD)

| Ensayo | Mutaciones | LOD | Valor de corte del ensayo | Sensibilidad (%) |
|-----------|------------|------|---------------------------|------------------|
| 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 |

| Ensayo | Mutaciones | LOD | Valor de corte del ensayo | Sensibilidad (%) |
|----------|------------|------|---------------------------|------------------|
| | R172M | 6.66 | | 3.31 |
| | R172S | 6.42 | | 14.93 |
| | R172W | 6.68 | | 2.36 |
| R100 Mut | R100Q | 4.65 | 4.65 | 3.45 |

Las mutaciones se detectan cuando ΔC_T es menor o igual que el LOD.

Efecto de la introducción de ADN

Se extrajo ADN de 4 muestras distintas de glioma: 2 con *IDH1/2* nativo y 2 portadoras de la mutación de *IDH1* R132H (395G>A).

Se analizaron tres volúmenes de ADN distintos (incluido el de la recomendación del protocolo) para evaluar el impacto de la introducción del ADN en los resultados cualitativos. Los resultados demostraron que la introducción de ADN no suponía ningún impacto en los resultados cualitativos. Sin embargo, se detectó un mayor número de errores técnicos (errores de CC para $C_{T \text{ Total}}$) cuando la introducción de ADN era inferior a la recomendada (<25 ng de ADN). Por lo tanto, se recomienda introducir 25 ng de ADN en un volumen de 5 μ l para realizar el análisis.

Repetibilidad y reproducibilidad

El estudio de precisión se realizó con 4 muestras distintas (ADN plasmídico añadido a ADN nativo de glioma representativo de muestras nativas (WT), mutadas y de corte) que se analizaron 40 veces por duplicado (n = 80 mediciones). En la tabla 17 se muestran las desviaciones estándar (SD) y los coeficientes de variación (CV).

Tabla 17. Resultados de precisión

| Ensayo | Muestra | ΔC_T medio | SD_R^* | SD_{Serie}^\dagger | SD_{Total}^\ddagger | CV_{Total} (%) [‡] | Tasa de resultados correctos |
|--------------|---------|-----------------------|----------|----------------------|-----------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 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: repetibilidad

† Serie: reproducibilidad entre series

‡ Total: precisión total (incluida entre equipos, operadores y lotes)

La tabla continúa en la página siguiente.

Tabla 17. Resultados de precisión (continuación)

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

* R: repetibilidad

† Serie: reproducibilidad entre series

‡ Total: precisión total (incluida entre equipos, operadores y lotes)

La tabla continúa en la página siguiente.

Tabla 17. Resultados de precisión (continuación)

| Assay | Sample | Mean ΔC_T | SD _R [*] | SD _{Run} [†] | SD _{Total} [‡] | CV _{Total} (%) [‡] | Correct calls rate |
|----------|--------|-------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| 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: repetibilidad

† Serie: reproducibilidad entre series

‡ Total: precisión total (incluida entre equipos, operadores y lotes)

Comparación de métodos

Comparación con la inmunohistoquímica (IHC) para la detección de *IDH1/R132H*.

Se realizó un estudio para demostrar la concordancia del estado mutacional entre el kit *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* e IHC (Anti-human *IDH1R132H* antibody clone H09 de DIANOVA).

Se seleccionaron un total de 103 muestras clínicas de glioma. El bloque más viejo fue de desde hace 10 años.

Todas las muestras superaron los controles de calidad del kit *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* y de IHC.

Los resultados demostraron un porcentaje de concordancia positiva (PCP) del 100%, un porcentaje de concordancia negativa (PCN) del 98% y un porcentaje de concordancia global (PCG) del 99% (véase la tabla 18).

Tabla 18. Análisis de la concordancia entre el kit *therascreen* RGQ PCR Kit e IHC

| Medida de concordancia | Frecuencia (%) | Intervalo de confianza del 95% |
|------------------------|----------------|--------------------------------|
| PCP | 45/45 (100%) | [92;100] |
| PCN | 57/58 (98%) | [91;100] |
| PCG | 102/103 (99%) | [96;100] |

Comparación con la secuenciación bidireccional

Se realizó un estudio para demostrar la concordancia del estado mutacional entre el kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR y la secuenciación bidireccional.

Se seleccionaron un total de 103 muestras clínicas tumorales de pacientes con glioma. El bloque más viejo fue de desde hace 10 años.

Las 103 muestras superaron los controles de calidad del kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR y 101 muestras generaron resultados para la secuenciación bidireccional.

Los resultados demostraron un porcentaje de concordancia positiva (PCP) del 100%, un porcentaje de concordancia negativa (PCN) del 92% y un porcentaje de concordancia global (PCG) del 96% (véanse las tablas 19 y 20).

Tabla 19. Kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR vs. secuenciación bidireccional

| | | Secuenciación bidireccional Sanger | | | | |
|---------------------------------------|--------|------------------------------------|-------|-------|-------|--------|
| | | R132* | R132C | R132H | R172† | Nativo |
| <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 |
| | Nativo | 0 | 0 | 0 | 0 | 47 |

* R132 significa que la muestra presenta la mutación R132, pero no las mutaciones R132H y R132C.

† R172 significa que la muestra presenta la mutación R172, pero no la mutación R172K.

Tabla 20. Análisis de concordancia con la secuenciación bidireccional

| Medida de concordancia | Frecuencia (%) | Intervalo de confianza del 95% |
|------------------------|----------------|--------------------------------|
| PCP | 50/50 (100%) | [93;100] |
| PCN | 47/51 (92%) | [81;97] |
| PCG | 97/101 (96%) | [90;98] |

Referencias

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).

Símbolos

La tabla siguiente describe los símbolos que pueden aparecer en las etiquetas o en este documento.



<N>

Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones



Fecha de caducidad



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



N.º de referencia



Número de lote



Número de material (etiquetado de los componentes)



Componentes (lista de los elementos incluidos)



Contiene (contenido)



Número (para viales, botellas, etc.)

Rn

“R” significa revisión del manual y “n” es el número de revisión



Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso



Precaución

Información para pedidos

| Producto | Contenido | Referencia |
|---|--|------------|
| <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20) | Para 20 reacciones: 9 mezclas de primers y sondas, control WT, control positivo, mezcla maestra, agua exenta de nucleasas | 873011 |
| Equipo Rotor-Gene Q MDx y accesorios | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de fusión de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí) más un canal HRM, equipo portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación | 9002033 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform | Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), equipo portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas | 9002032 |
| Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes | Bloque de aluminio para la configuración de reacción manual con pipeta de un solo canal en tubos de 72 x 0,1 ml | 9018901 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) | 250 tiras de 4 tubos y tapones para 1.000 reacciones | 981103 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500) | 10 x 250 tiras de 4 tubos y tapones para 10.000 reacciones | 981106 |

| Producto | Contenido | Referencia |
|---|--|------------|
| QIAamp DNA FFPE Tissue Kit: para la purificación de ADN genómico obtenido de tejidos impregnados en parafina | | |
| QIAasymphony DNA Mini Kit (192) | Para 192 preparaciones de 200 µl cada una: incluye 2 cartuchos de reactivos, bandejas para enzimas y accesorios | 56404 |
| QIAasymphony DSP DNA Mini Kit: para la purificación automatizada de ADN de entre 1 y 96 muestras | | |
| QIAasymphony DNA Mini Kit (192) | Para 192 preparaciones de 200 µl cada una: incluye 2 cartuchos de reactivos, bandejas para enzimas y accesorios | 937236 |
| QIAasymphony SP y accesorios | | |
| QIAasymphony SP System | Módulo de preparación de muestras QIAasymphony: incluye instalación y formación y 1 año de garantía en piezas y mano de obra | 9001751 |
| QIAasymphony SP | Módulo de preparación de muestras QIAasymphony: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra | 9001297 |
| Sample Prep Cartridges, 8-well (336) | Cartuchos para la preparación de muestras de 8 pocillos para su uso con QIAasymphony SP | 997002 |
| 8-Rod Covers (144) | Tapas de 8 ruedas para su uso con QIAasymphony SP | 997004 |
| Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024) | Puntas con filtro desechables, en bandejas; (8 x 128). Para uso con QIAcube y los equipos QIAasymphony SP/AS | 990332 |
| Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP | Puntas con filtro desechables, en bandejas; (8 x 128). Para uso con los | 997024 |

| Producto | Contenido | Referencia |
|------------------------------------|---|------------|
| (1024) | equipos QIASymphony SP/AS | |
| Elution Microtubes CL (24 x 96) | Tubos de polipropileno no estériles (0,85 ml de capacidad máxima, menos de 0,7 ml de capacidad de almacenamiento, 0,4 ml de capacidad de elución); 2.304 en bandejas de 96; incluye tiras de tapones | 19588 |
| Reactivos | | |
| RNase A (17.500 U) | 2,5 ml (100 mg/ml; 7.000 unidades/ml, solución) | 19101 |
| Buffer ATL (200 ml) | 200 ml de tampón de lisis para tejidos para 1.000 preparaciones | 19076 |

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de usuario o el manual de uso del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Este producto está destinado para el Diagnóstico in Vitro. Los productos QIAGEN no deben ser revendidos, modificados para reventa ni utilizados para fabricar otros productos comerciales sin autorización por escrito de QIAGEN.

La información del presente documento puede ser modificada sin previo aviso. QIAGEN no asume ninguna responsabilidad por los errores que puedan aparecer en este documento. Este documento se considera íntegro y exacto en el momento de su publicación. QIAGEN declina toda responsabilidad por daños fortuitos, especiales, múltiples o derivados del uso de este documento.

Se garantiza que los productos QIAGEN cumplen las especificaciones indicadas. La única obligación de QIAGEN y la única compensación al cliente se limitan a la sustitución de los productos sin cargo en el caso de que estos no funcionen de acuerdo a la garantía.

La compra de este producto permite al comprador utilizarlo en el rendimiento de servicios diagnósticos para diagnóstico humano in vitro. Por la presente no se otorga ninguna patente general ni otra licencia de ningún tipo, distinta de este derecho específico de uso derivado de la compra.

Las mutaciones de *IDH1/2* y los usos que se hagan de las mismas, están protegidos por derechos de patente, entre los que se incluyen las patentes europeas EP2326735 y EP2546365, las solicitudes de patente en Estados Unidos US2011229479 y US2012202207, y sus equivalentes en otros países.

La compra de este producto no confiere ningún derecho de empleo en ensayos clínicos de fármacos dirigidos a *IDH1/2*. QIAGEN desarrolla programas de licencia específicos para tales usos. Póngase en contacto con nuestro departamento jurídico a través de idhlicenses@qiagen.com.

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

Acuerdo de licencia limitada para el kit *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR

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

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en estos kits con componentes no incluidos en los mismos, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para otros usuarios. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Estos kits y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario de los kits aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual con relación a este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

HB-1566-004 1075247 154034217 08/2016

© 2013–2016 QIAGEN, reservados todos los derechos.

