

Juli 2020

Håndbog til *therascreen*[®] IDH1 /2 RGQ PCR Kit



Version 1

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

IVD

Til in vitro-diagnostisk brug

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

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R5 **MAT**

1119896DK

Indhold

Tilsligtet anvendelse	5
Oversigt og forklaring	6
Funktionsprincip	8
Medfølgende materialer	10
Kit-indhold	10
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	12
Advarsler og forholdsregler.....	14
Sikkerhedsinformation	14
Generelle forholdsregler.....	14
Opbevaring og håndtering af reagenser	16
Forsendelsesbetingelser	16
Opbevaringsforhold	16
Stabilitet.....	16
Håndtering og opbevaring af prøver.....	17
Procedure	18
DNA-ekstrahering og -forberedelse	18
Protokol: Påvisning af <i>IDH1/2</i> -mutationer	22
Fortolkning af resultater	27
Vandkontroller	27
Kvalitetskontrol med C_T -værdier for kontroller	27
Validering af prøveinput.....	30
Prøveresultater	30

Fejlfindingsvejledning	36
Kvalitetskontrol	39
Begrænsninger	40
Ydelseskarakteristika	42
Tomgrænse (LOB)	42
Påvisningsgrænse (LOD)	42
Effekt af DNA-input	44
Repeterbarhed og reproducerbarhed	44
Metodesammenligning	47
Litteraturhenvisninger	50
Symboler	52
Bestillingsinformation	54
Revisionshistorik for dokumentet	57

Tilsligtet anvendelse

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

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

Oversigt og forklaring

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

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

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

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

* COSMIC-id'er stammer fra Catalog of Somatic Mutations in Cancer (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Funktionsprincip

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

- 3 totale amplifikationsreaktioner af codon 132 og 100 for *IDH1*-genet og af codon 172 for *IDH2*-genet
- 3 mutationsamplifikationsreaktioner af codon 132 og 100 for *IDH1*-genet og af codon 172 for *IDH2*-genet
- 3 mutationspecifikke amplifikationsreaktioner for *IDH1* R132H-, *IDH1* R132C- og *IDH2* R172K-mutationer

Totale reaktionsblandinger

PPM-Total (totale primer- og probeblandinger) bruger primere og prober til at forstærke både muterede og vildtypemålssekvenser (Figur 1).

Reaktionsblandinger til mutationspåvisning

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

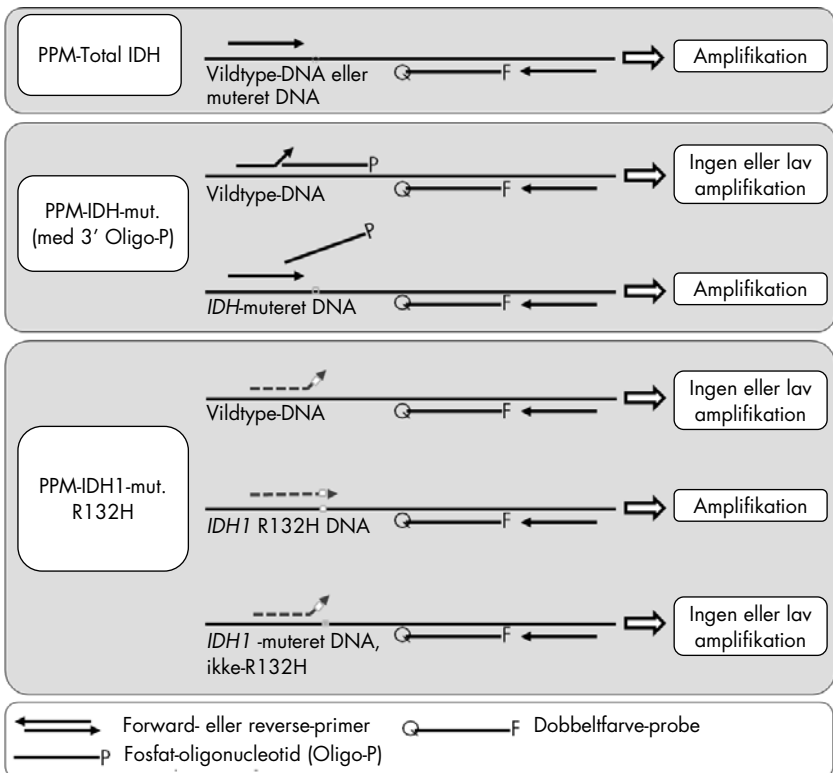
Når PCR-skabelonen indeholder vildtypesekvens, dominerer 3'-fosfat-oligonukleotiden over PCR-primerbindingen pga. højere affinitet. Der observeres ingen eller lav udvidelse af DNA polymerasen og ingen eller lav amplifikation.

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

Reaktionsblandinger til mutationsidentifikation

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

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



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

Medfølgende materialer

Kit-indhold

<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalognummer		873011
Antal reaktioner		20
Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> (Primere og probeblanding til påvisning af total <i>IDH1/R132</i>) (vildtype og muteret)	PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Primere og probeblanding til påvisning af total <i>IDH2/R172</i>) (vildtype og muteret)	PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Primere og probeblanding til påvisning af total <i>IDH1/R100</i>) (vildtype og muteret)	PPM-Total <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R132</i> (Primere og probeblanding (inklusive Oligo-P) til påvisning af muteret <i>IDH1/R132</i>)	PPM- <i>IDH1/R132</i> -mut. 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH2/R172</i> (Primere og probeblanding (inklusive Oligo-P) til påvisning af muteret <i>IDH2/R172</i>)	PPM- <i>IDH2/R172</i> -mut. 25x	40 µl
Primers and Probe mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R100</i> (Primere og probeblanding (inklusive Oligo-P) til påvisning af muteret <i>IDH1/R100</i>)	PPM- <i>IDH1/R100</i> -mut. 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132H (Primere og probeblanding til identifikation af <i>IDH1</i> -mut. R132H)	PPM- <i>IDH1</i> -mut. R132H 25x	40 µl

Tabel fortsættes på næste side

Kit-indhold (fortsat)

<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalognummer		873011
Antal reaktioner		20
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132C (Primere og probeblanding til identifikation af <i>IDH1</i> -mut. R132C)	PPM-IDH1-mut. R132C 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH2</i> -mut. R172K (Primere og probeblanding til identifikation af <i>IDH2</i> -mut. R172K)	PPM-IDH2-mut. R172K 25x	40 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Wild Type Genomic DNA (Genomisk <i>IDH1/IDH2</i> -vildtype-DNA)	<i>IDH1/IDH2</i> -vildtypekontrol	270 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Mutated Positive Control (<i>IDH1/IDH2</i> -muteret positiv kontrol)	Positiv <i>IDH1/IDH2</i> -kontrol	270 µl
Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR (Blanding af <i>Taq</i> DNA-polymerase, dNTPs, MgCl ₂ og buffer til qPCR)	qPCR-master-blanding 2x	5 x 900 µl
Nuclease-Free Water (Nukleasefrit vand)	Nukleasefrit vand	5 x 525 µl
<i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> håndbog (engelsk)		1

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

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

Vigtigt: Sørg for, at de instrumenter, der bruges i denne procedure, er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

Reagenser (manuel DNA-ekstrahering)

- DNA-ekstraheringskit: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (kat.-nr. 56404)
- RNase A (17,500 U) (kat.-nr. 19101)
- Xylen eller Histolemon™ (Carlo Erba, kat.-nr. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Ethanol (96-100%)
- 1x TE-buffer, pH 8,0

Reagenser (automatisk DNA-ekstrahering)

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

Forbrugsartikler

- Skalpeller
- Nukleasefrie, aerosol-resistente, sterile PCR-pipettespidser med hydrofobiske filtre
- 2,0 ml eller 1,5 ml nukleasefrie rør

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, til Rotor-Gene Q (kat.-nr. 981 103 eller 981 106)
- Is

Flere forbrugsvarer til automatisk DNA-ekstrahering

- Sample Prep Cartridges, 8-well (kat.-nr. 997002)
- 8-Rod Covers (kat.-nr. 997004)
- Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (kat.-nr. 990332) og Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (kat.-nr. 997024)
- Elution Microtubes CL (kat.-nr. 19588)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (Sarstedt®, kat.-nr. 72.693, www.sarstedt.com)

Udstyr

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

Yderligere udstyr til automatisk oprensning

- QIASymphony SP-instrument
- QIASymphony SP-softwareversion 4.0 eller nyere

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug

Sikkerhedsinformation

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere information. De findes online i PDF-format på www.qiagen.com/safety, hvor sikkerhedsdatabladene for hvert QIAGEN-kit og hver kit-komponent kan læses og udskrives.

Der findes sikkerhedsinformation for oprensingskittet i den relevante kit-håndbog. Der findes sikkerhedsinformationer om instrumenterne i brugervejledningen til de pågældende instrumenter.

Generelle forholdsregler

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

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

Opbevaring og håndtering af reagenser

Forsendelsesbetingelser

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit forsendes på tøris. Hvis nogen af komponenterne i *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ikke er frosne ved modtagelse, hvis den ydre emballage har været åbnet under transporten, eller hvis forsendelsen ikke indeholder en følgeseddel, denne håndbog eller reagenserne, skal der rettes henvendelse til en af QIAGEN Teknisk Service eller lokale forhandlere (se www.qiagen.com).

Opbevaringsforhold

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

Stabilitet

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

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

Håndtering og opbevaring af prøver

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

- Vævsprøver skal fikseres i 4-10 % neutralt bufret formalin (Neutral Buffered Formalin, NBF).
- 10 µm serielle sektioner skal afskæres fra paraffinblokken og monteres på objektglassene.
- En uddannet person (f.eks. en patolog) skal vurdere tumorindholdet og området på en Hematoxylin- og Eosin-farvet (H&E) sektion. Brug serielle sektioner til DNA-ekstrahering.
- Kun sektioner med ≥ 40 % tumorindhold kan bruges til testen.
- For sektioner med et vævsområde < 50 mm², anbefaler vi at behandle et tilstrækkeligt antal sektioner til at øge det samlede vævsområde til mindst 50 mm² (100 mm² for automatisk ekstrahering på QIA Symphony SP).
- Mærk, håndter og opbevar tumorprøver, blokke, objektglas og prøver, der er klar til ekstrahering på en kontrolleret måde i henhold til lokale procedurer.
- Opbevar FFPE-blokke og objektglas ved stuetemperatur. Objektglas kan opbevares ved stuetemperatur i op til 4 uger før DNA-ekstrahering til brug med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- Efter ekstrahering kan genomisk DNA opbevares i op til 1 uge ved 2-8 °C eller i 8 uger ved -25 °C til -15 °C.


Procedure

DNA-ekstrahering og -forberedelse

Brug QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat.-nr. 56404) eller QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.-nr. 937236) til oprensning af genomisk DNA fra prøver, der klargøres fra FFPE-hjernecancerprøver.

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

Brug af QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

<p>FORSIGTIG</p> 	<p>Læs omhyggeligt om følgende ændringer, der skal implementeres i QIAamp-protokollen.</p>
---	--

- Se "Startmateriale" i *QIAamp DNA FFPE Tissue håndbog* og Håndtering og opbevaring af prøver, side 17 i denne håndbog for at få oplysninger om klargøring af prøver før deparaffinering og DNA-ekstrahering.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit må kun anvendes manuelt.
- Det RNase-trin, der er beskrevet i *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook* (håndbog til QIAamp DNA FFPE Tissue), skal udføres.
- Brug ikke QIAGEN Deparaffinization Solution. Brug kun xylene-/ethanol-metoden til deparaffinering som beskrevet i "Deparaffineringsprocedure for objektglas ved brug af QIAamp DNA FFPE Tissue Kit", nedenfor. Xylen kan erstattes med Histolemon (xylene-erstatning).
- Udfør proteinase K-fordøjelse i 1 time.

- Prøverne skal elueres to gange i 30 µl elutionsbuffer (Buffer ATE) fra QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Deparaffineringsprocedure for objektglas ved brug af QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

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

Fortsæt med inkuberingstrinnet ved 90 °C i QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-protokollen (trin 12 i *QIAamp DNA FFPE Tissue håndbog*, juni 2012, side 13).

Brug af QIASymphony DSP DNA Mini Kit

FORSIGTIG



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

- Se "Håndtering og opbevaring af prøver", side 17, for at få oplysninger om klargøring af prøver før deparaffinering og DNA-ekstrahering.
- Det RNase-trin, der er beskrevet i QIASymphony SP-protokolarket, skal udføres.
- Brug ikke QIAGEN Deparaffinization Solution. Brug kun xylene-/ethanol-metoden til deparaffinering som beskrevet i Deparaffineringsprocedure for objektglas ved brug af QIASymphony DSP DNA Mini Kit nedenfor. Xylen kan erstattes med Histolemon (xylene-erstatning).
- Udfør proteinase K-fordøjelse i 1 time.
- 50 µl elueringsmængden skal vælges på berøringsskærmen.

Deparaffineringsprocedure for objektglas ved brug af QIASymphony DSP DNA Mini Kit

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

1. Placer objektglassene i et bestemt objektglasrack.
2. Sæt objektglasracket i et objektglasbad, der indeholder xylene eller Histolemon, i 2 minutter. Ryst med 2 eller 3 bevægelser tilbage og fremad.
3. Placer racket i et andet objektglasbad, der indeholder ethanol (96-100 %), i 2 minutter. Ryst med 2 eller 3 bevægelser tilbage og fremad.
4. Tør objektglassene ved 15-37 °C. Dette tager nogle få minutter.
5. Opmærk mikrocentrifugeringsrør med 1,5 ml for hver prøve, og fjøj 220 µl Buffer ATL til hvert rør.

6. Placer nogle få dråber Buffer ATL på vævssektionerne på objektglassene (nok til at dække væsoverfladen).
7. Skrab vævsområdet med en steril skalpel, og føj det skrabeede væv til det tilsvarende opmærkede mikrocentrifugerør.
8. Tilsæt 20 µl proteinase K (fra QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) i hvert rør, og bland med vortexing.

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

Genomisk DNA

Opbevar genomisk DNA ved 2-8 °C i op til 1 uge efter ekstrahering eller i 8 uger ved -25 °C til -15 °C.

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

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

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

Protokol: Påvisning af *IDH1/2*-mutationer

Vigtige anvisninger før start

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

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

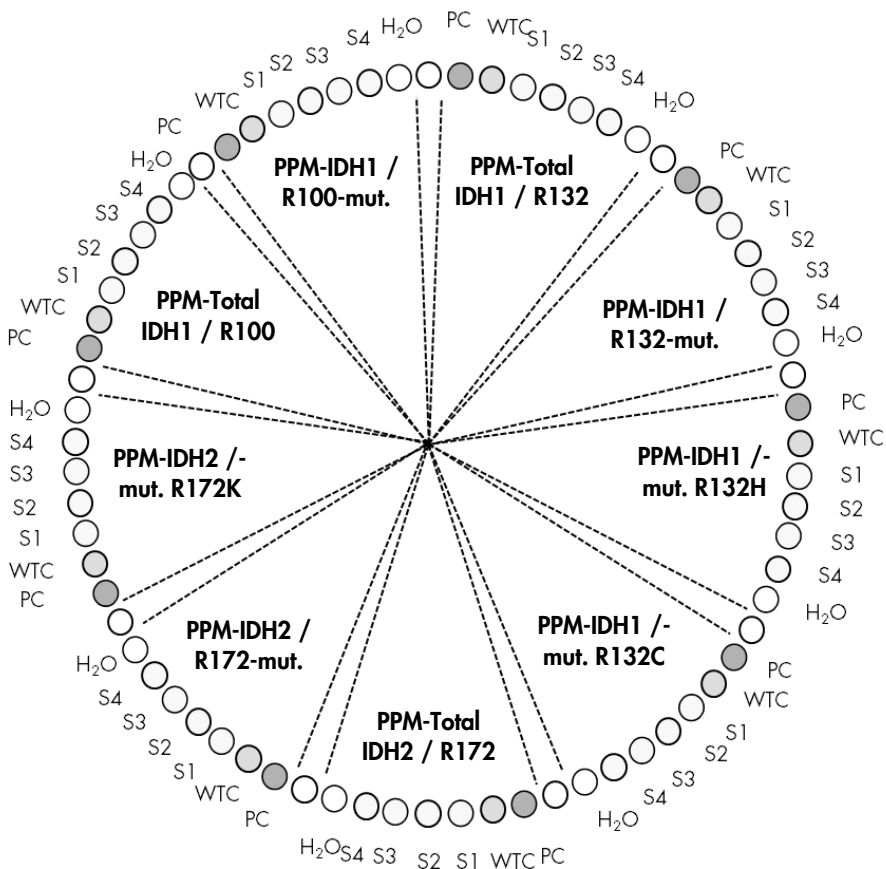
Prøver	Reaktioner
n DNA-prøver	n x 1 reaktion
2 DNA-kontroller	2 reaktioner: Positive og vildtype kontroller, der hver testes én gang pr. PCR-kørsel
Vandkontrol	1 reaktion

Tabel 3. Foreslået isætningsblok til et eksperiment med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Prøve	Total IDH1/ R132		IDH1/ R132H		IDH1-mut. R132C		Total IDH2/ R172		IDH2/ R172-mut.		IDH2-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							
Tomt rør																

* PC: Positive control (Positiv kontrol).

† WTC: Wild-type control (Vildtypekontrol).



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

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

Procedure

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

Bemærk: Alle koncentrationer er til den endelige volumen af reaktionen.

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

Tabel 4. Klargøring af PCR-blandinger

Komponent	1 reaktion (µl)	For-blanding: 7 + 1 reaktioner (µl)	Endelig koncentration
qPCR-master-blanding, 2x	12,5	100	1x
PPM, * 25x	1	8	1x
Nuclease-Free Water (Nukleasefrit vand)	6,5	52	–
Prøve eller kontrol† (der skal tilsættes i trin 4)	5	5 hver	–
Samlet volumen	25	25 hver	–

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

† Positiv kontrol, negativ kontrol eller vandkontrol.

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

Tabel 5. Temperaturprofil

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

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

Fortolkning af resultater

Vandkontroller

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

Hvis der opnås en positiv C_T -værdi med en vandkontrol, skyldes dette krydskontaminering. Se "Fejlfindingsvejledning", side 36, for at finde en løsning.

Kvalitetskontrol med C_T -værdier for kontroller

IDH1/2-vildtypekontrollen (Wild-Type Control, WTC) og den muterede positive *IDH1/2*-kontrol (Mut-PC) giver mulighed for at validere eksperimentet.

- Hvis der ikke er nogen C_T -værdi, klassificeres kontrollen som mutationsnegativ for den pågældende påvisningsanalyse.
- Hvis der påvises C_T -værdier, skal ΔC_T beregnes på følgende måde for hver kontrol

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

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

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

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

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

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

Kontrollerne klassificeres som mutationspositive, hvis ΔC_T -værdierne er mindre end eller lig med de respektive ΔC_T -cutoff-værdier, der er angivet i Tabel 6. Hvis ΔC_T -værdien er højere end cut-off-værdien, klassificeres kontrollen som mutationsnegativ for den pågældende mutationsanalyse.

Tabel 6. Cutoff-værdier for hver mutationsanalyse

Mutationsanalyse	Cut-off (ΔC_T)
IDH1/R132-mut.	5,34
IDH2/R172-mut.	6,42
IDH1/R100-mut.	4,65
IDH1-mut. R132H	6,87
IDH1-mut. R132C	7,14
IDH2-mut. R172K	8,49

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

Hele eksperimentet afvises, hvis den ene eller begge betingelser ikke er opfyldt.

Table 7. Eksempel på kørselsvalidering på kontroller

Værdi	Vand (NTC)	IDH1/IDH2-vildtypekontrol	Positiv IDH1/IDH2-kontrol
C_T Total IDH1/R132	Ikke påvist	25,45	23,95
C_T IDH1/R132.mut.	Ikke påvist	34,32	25,76
ΔC_T IDH1/R132.mut.	Ikke påvist	8,87	1,81
C_T Total IDH2/R172	Ikke påvist	25,42	24,93
C_T IDH2/R172.mut.	Ikke påvist	34,36	26,36
ΔC_T IDH2/R172.mut.	Ikke påvist	8,94	1,43
C_T Total IDH1/R100	Ikke påvist	26,30	24,69
C_T IDH1/R100.mut.	Ikke påvist	33,04	26,39
ΔC_T IDH1/R100.mut.	Ikke påvist	6,74	1,70
C_T IDH1.mut. R132H	Ikke påvist	35,20	26,48
ΔC_T IDH1.mut. R132H	Ikke påvist	9,75	2,53
C_T IDH1.mut. R132C	Ikke påvist	37,16	27,07
ΔC_T IDH1.mut. R132C	Ikke påvist	11,71	3,12
C_T IDH2.mut. R172K	Ikke påvist	Ikke påvist	27,97
ΔC_T IDH2.mut. R172K	Ikke påvist	Ikke relevant	3,04

Validering af prøveinput

Et prøveinput skal valideres før fortolkning.

Den opnåede C_T -værdi for en prøve med hver PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ og $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) skal være lavere end 32,00. $C_{T \text{ Total}}$ -værdier $\geq 32,00$ skyldes dårlig DNA-kvalitet. Prøven skal testes igen. Hvis kvantiteten af DNA'et stadig er utilstrækkelig, skal der ekstraheres mere væv, hvis det er tilgængeligt (se "Fejlfindingsvejledning" på side 36).

Prøveresultater

IDH1/2-mutationspåvisning

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

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

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

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

Hvis der ikke er nogen C_T -værdi for en mutationspåvisningsanalyse, skal prøven klassificeres som mutationsnegativ for den pågældende mutation.

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

Tabel 8. Cutoff-værdier for hver mutationspåvisningsanalyse

Mutationsanalyse	Cut-off (ΔC_T)
IDH1/R132-mut.	5,34
IDH2/R172-mut.	6,42
IDH1/R100-mut.	4,65

IDH1/2-mutationsidentifikation

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

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

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

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

Hvis der ikke er nogen C_T -værdi for en mutationsidentifikationsanalyse, skal prøven klassificeres som mutationsnegativ.

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

Tabel 9. Cutoff-værdier for hver mutationsidentifikationsanalyse

Mutationsanalyse	Cut-off (ΔC_T)
IDH1-mut. R132H	6,87
IDH1-mut. R132C	7,14
IDH2-mut. R172K	8,49

Tabel 10. Eksempel på IDH1/2-mutationspåvisning

Værdi	Prøve 1	Prøve 2
C_T Total IDH1/R132	26,39	26,32
C_T IDH1/R132-mut.	33,86	28,29
ΔC_T IDH1/R132-mut.	7,47	1,97
C_T Total IDH2/R172	26,79	25,79
C_T IDH2/R172-mut.	35,13	35,21
ΔC_T IDH2/R172-mut.	8,34	9,42
C_T Total IDH1/R100	27,20	27,37
C_T IDH1/R100-mut.	33,83	33,76
ΔC_T IDH1/R100-mut.	6,63	6,39
Mutationspåvisning	Ingen mutation påvist	R132-mutation påvist

Table 11. Example of IDH1/2-mutation identification

Værdi	Prøve 1	Prøve 2
C_T Total IDH1/R132	26,39	26,32
C_T IDH1-mut. R132H	33,82	28,27
ΔC_T IDH1-mut. R132H	7,43	1,95
C_T Total IDH1/R132	26,39	26,32
C_T IDH1-mut. R132C	37,94	Ikke påvist
ΔC_T IDH1-mut. R132C	11,55	Ikke relevant
C_T Total IDH2/R172	26,79	25,79
C_T IDH2-mut. R172K	Ikke påvist	Ikke påvist
ΔC_T IDH2-mut. R172K	Ikke relevant	Ikke relevant
Mutationsidentifikation	Ingen mutation påvist	Mutation påvist for R132H

Fortolkning af *IDH1/2*-mutationer

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

Tabel 12. Fortolkningsvejledning

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

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

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

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

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

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

	Prøve 3	Prøve 4
ΔC_T <small>IDH1/R132-mut.</small>	1,24	5,24
ΔC_T cutoff <small>IDH1/R132-mut.</small>	5,34	5,34
(ΔC_T cutoff – ΔC_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
(ΔC_T cutoff – ΔC_T) <small>IDH2/R172-mut.</small>	1,10	0,47
Fortolkning af resultater	R132 muteret	R172 muteret

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. Der findes flere oplysninger på www.qiagen.com.

Kommentarer og forslag

Tilstoppet kolonne under DNA-ekstrahering

Ufuldstændig lysis	Gentag centrifugering.
	Det resterende lysat kan overføres til en ny kolonne.
	Gentag ekstraheringskørslen med mindre FFPE-væv.

Utilstrækkeligt DNA i ekstraheringseluatet

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

IDH1/2-vildtypekontrol ikke påvist

- | | |
|---|--|
| a) Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser; rør- eller brøndinversion | Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen.
Gentag PCR-kørslen. |
| b) Forkert opbevaring af kitkomponenter | Opbevar <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit ved -30°C til -15°C, og beskyt primer- og probeblandinger mod lys. Se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 16.
Et reagens må højst indfryses og optøs 5 gange. |
| c) <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit er for gammelt | Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug evt. et nyt <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |

IDH1/2-positiv kontrol ikke påvist

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

Kommentarer og forslag

- b) Forkert opbevaring af kitkomponenter
Opbevar *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ved -30°C til -15°C, og beskyt primer- og probeblandinger mod lys. Se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 16.

Et reagens må højst indfryses og optøs 5 gange.
- c) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit er for gammelt
Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug evt. et nyt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Intet signal, herunder intet signal for kontroller

- a) Intet reaktionsrør i position 1 for Rotor-Gene Q MDx-instrumentet
Sørg for altid at placere en prøve i position 1 på rotoren. Ellers vil instrumentet ikke foretage nogen kalibrering, og der vil blive hentet forkerte fluoescensdata.
- b) Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser; rør- eller brøndinversion
Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen.

Gentag PCR-kørslen.
- c) Forkert opbevaring af kitkomponenter
Opbevar *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ved -30°C til -15°C, og beskyt primer- og probeblandinger mod lys. Se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 16.

Et reagens må højst indfryses og optøs 5 gange.
- d) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit er for gammelt
Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug evt. et nyt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- e) Forkert påvisningskanal valgt
Angiv påvisningskanalen til Cycling Green eller 530 nm/640 nm.
- f) Intet datahentningsprogram
Kontrollér cyklusprogrammet. Se Tabel 5 på side 26.

Vælg hentningstilstanden **Single** (Enkel) ved afslutningen af hvert afhædningssegment i PCR-programmet.

Kommentarer og forslag

Fluorescensintensiteten varierer

Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser; rør- eller brøndinversion

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

Fluorescensintensitet for lav

- a) Forkert opbevaring af kitkomponenter
- Opbevar *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ved -30°C til -15°C, og beskyt primer- og probeblandinger mod lys. Se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 16.
- Et reagens må højst indfryses og optøs 5 gange.
- b) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit er for gammelt
- Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (s kittets etiket), og brug evt. et nyt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- c) Meget lav DNA-målmængde
- Kontrollér altid DNA-koncentrationen før start. Se "DNA-ekstrahering og forberedelse", side 18.

Negativ kontrol (H₂O) giver et positivt resultat

Krydskontaminering, reagenskontaminering, instrumentfejl, ombytning af brønd eller kapillærrør eller probeforringelse

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

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

Beskyt primer- og probeblandinger mod lys.

Kontrollér for falsk positive værdier på fluorescenskurver.

Kontrollér konfigurationen af reaktionen. Se "Protokol: Påvisning af IDH1/2-*mutationer*", side 22.

Kvalitetskontrol

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

Begrænsninger

Kittet er beregnet til professionel brug.

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

Dette kit skal bruges i henhold til instruktionerne i denne vejledning sammen med et valideret instrument, som angivet i "Nødvendige materialer, som ikke medfølger", side 12.

Bemærk nøje udløbsdatoerne, der er trykt på æsken og etiketterne til alle komponenter. Brug ikke komponenter, der er for gamle.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit er kun valideret til bufret, formalinfixeret, paraffinindstøbt hjernevæv.

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

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

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

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

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

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

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

Ydelseskarakteristika

Tomgrænse (LOB)

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

LOB-resultaterne er angivet i Tabel 15.

Tabel 15. Tomgrænse (LOB)

Analyse	LOB	Endelig LOB
R132-mut.	Valideringslot 1: 6,57 Valideringslot 2: 6,32	6,32
R132H-mut.	Valideringslot 1: 7,91 Valideringslot 2: 8,22	7,91
R132C-mut.	Valideringslot 1: 8,04 Valideringslot 2: 8,20	8,04
R172-mut.	Valideringslot 1: 7,74 Valideringslot 2: 7,59	7,59
R172K-mut.	Valideringslot 1: 9,93 Valideringslot 2: 10,58	9,93
R100-mut.	Valideringslot 1: 6,52 Valideringslot 2: 5,19	5,17

Påvisningsgrænse (LOD)

Påvisningsgrænsen (LOD eller analysesensitivitet) blev bestemt ud fra den "precision profile approach" (præcisionsprofilmetode), der er beskrevet i retningslinjen CLSI/NCCLS EP17-A (14). Fem lave positive prøve (plasmid-DNA tilsat i vildtype gliom-DNA) blev brugt pr. mutation (30 til 110 målinger pr. mutationstype og mutationsprocent).

LOD-resultaterne er angivet i Tabel 16.

Table 16. Påvisningsgrænse (Limit of Detection, LOD)

Analyse	Mutationer	LOD	Analyse-cutoff	Sensitivitet (%)
R132H-mut.	R132H	6,87	6,87	0,78
R132C-mut.	R132C	7,14	7,14	1,19
R172K-mut.	R172K	8,49	8,49	0,61
R132-mut.	R132H	5,50	5,34	2,32
	R132C	5,34		4,35
	R132L	5,42		2,30
	R132G	5,61		2,23
	R132S	5,42		2,75
	R132V	5,56		2,24
R172-mut.	R172K	6,42	6,42	1,06
	R172G	6,58		3,00
	R172M	6,66		3,31
	R172S	6,42		14,93
	R172W	6,68		2,36
R100-mut.	R100Q	4,65	4,65	3,45

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

Effekt af DNA-input

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

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

Repeterbarhed og reproducerbarhed

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

Standardafvigelser (Standard Deviations, SD) og variationskoefficienter (Coefficients of Variation, CV) er angivet i Tabel 17.

Tabel 17. Præcisionsresultater

Analyse	Prøve	Middel ΔC_T	SD_R^*	$SD_{Kørsel}^\dagger$	SD_{Total}^\ddagger	$CV_{Total} (\%)^\ddagger$	Korrekte bestemmelsesforhold
R132C-mut.	WT	11,58	1,08	0,00	1,11	10	100% (78/78)
	5%	5,19	0,26	0,23	0,46	9	100% (76/76)
	10%	4,37	0,27	0,14	0,48	11	100% (78/78)
	30%	2,62	0,20	0,21	0,46	18	100% (78/78)
R132H-mut.	WT	10,87	1,48	0,00	1,48	14	100% (78/78)
	5%	4,46	0,27	0,05	0,31	7	100% (78/78)
	10%	3,57	0,28	0,14	0,31	9	100% (76/76)
	30%	1,86	0,21	0,20	0,30	16	100% (72/72)
R172K-mut.	WT	12,20	0,31	0,17	0,39	3	100% (66/66)
	5%	6,19	0,50	0,00	0,63	10	100% (76/76)
	10%	5,23	0,32	0,20	0,48	9	100% (76/76)
	30%	3,68	0,18	0,11	0,36	10	100% (76/76)

* R: Repeterbarhed.

† Kørsel: Reproducerbarhed mellem kørsler.

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

Tabel fortsættes på næste side

Table 17. Præcisionsresultater (fortsat)

Analyse	Prøve	Middel ΔC_T	SD_R^*	$SD_{Kørsel}^\dagger$	SD_{Total}^\ddagger	$CV_{Total} (\%)^\ddagger$	Korrekte bestemmelsesforhold
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	
R172-mut.	WT	9,47	0,91	0,87	1,45	15	100% (66/66)
	5%	4,45	0,35	0,12	0,56	13	100% (76/76)
	10%	3,55	0,29	0,02	0,53	15	100% (76/76)
	30%	2,05	0,18	0,15	0,47	23	100% (76/76)

* R: Repeterbarhed.

† Kørsel: Reproducerbarhed mellem kørsler.

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

Metodesammenligning

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

Der blive udført en undersøgelse for at vise sammenfaldet mellem mutationsstatus som vurderet med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit og med IHC (Anti-human IDH1R132H antistof-klon H09, DIANOVA).

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

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

Resultaterne viste en positiv procentvis overensstemmelse (Positive Percentage Agreement, PPA) på 100 %, en negativ procentvis overensstemmelse (Negative Percentage Agreement, NPA) på 98 % og en samlet procentvis overensstemmelse (Overall Agreement, OA) på 99 % (Tabel 18).

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

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

Sammenligning med bidirektional sekventering

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

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

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

Resultaterne viste en positiv procentvis overensstemmelse (Positive Percentage Agreement, PPA) på 100 %, en negativ procentvis overensstemmelse (Negative Percentage Agreement, NPA) på 92 % og en samlet procentvis overensstemmelse (Overall Agreement, OA) på 96 % (Tabel 19 og 20).

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

		Sanger-bidirektional sekventering				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT
therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172†	0	0	0	0	1
	WT	0	0	0	0	47

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

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

Tabel 20. Analyse af overensstemmelse med bidirektional sekventering

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

Litteraturhenvisninger

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

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

Symboler

Følgende tabel beskriver de symboler, der kan forekomme på etiketterne eller i dette dokument.



<N>

Indeholder tilstrækkeligt med reagenser til <N>-reaktioner



Holdbarhedsdato

IVD

Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik

REF

Katalognummer

LOT

Lotnummer

MAT

Materialenummer (dvs. etiketten på komponenten)

COMP

Komponenter (dvs. en liste over de medfølgende komponenter)

CONT

Indeholder (indhold)

NUM

Antal (dvs. hætteglas, flasker)

Rn

R står for revision af håndbogen og n er revisionsnummeret



Globalt handelsvarenummer



Temperaturbegrænsning



Producent



Læs brugsanvisningen



Forsigtig

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	Til 20 reaktioner: 9 primer- og probeblandinger, vildtypekontrol, positiv kontrol, master-blanding, nukleasefrit vand	873011
Rotor-Gene Q MDx og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, lilla) samt HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør, 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, lilla), bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse ikke inkluderet	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktion med en etkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 strips a 4 rør og hætter til 1.000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 strips a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – til oprensning af genomisk DNA fra paraffinindstøbt væv		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargøringer: 50 QIAamp MinElute® Columns, proteinase K, buffere og Collection Tubes (2 ml)	56404

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
QIASymphony DSP DNA Mini Kit – til automatiseret oprensning af DNA fra 1-96 prøver		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Til 192 præparationer a 200 µl: Indeholder 2 reagenspatroner og enzymracks samt tilbehør	937236
QIASymphony SP og tilbehør		
QIASymphony SP System	QIASymphony-prøveklargøringsmodul: inklusive installation og uddannelse, 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony-prøveklargøringsmodul: inkluderer 1 års garanti på reservedele og arbejds løn	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-brønds-prøveklargøringskassetter til brug med QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers til brug sammen med QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Engangsfilterspidser i rack (8 x 128). Til brug med QIAcube- og QIASymphony SP/AS-instrumenterne	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Engangsfilterspidser i rack (8 x 128). Til brug sammen med QIASymphony SP/AS-instrumenter	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Usterile polypropylenrør (0,85 ml maksimumkapacitet, under 0,7 ml opbevaringskapacitet, 0,4 ml elueringskapacitet); 2304 i racks a 96; inkluderer hæftestrips	19588

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

Opdaterede licensoplysninger og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser findes i håndbogen eller brugervejledningen til det pågældende QIAGEN-kit. Håndbøger og brugervejledninger til QIAGEN-kits kan fås via www.qiagen.com eller rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale distributør.

Revisionshistorik for dokumentet

Dato	Ændringer
R5, juli 2020	<p>Revideret afsnittet Fortolkning af resultater med tilføjelse af oplysninger om klassifikation af kontroller og prøver afhængigt af påvist C_T-værdi</p> <p>Revideret kolonnen IDH1/IDH2-vildtypekontrol i Tabel 7 for C_T IDH-mut. R172K og ΔC_T IDH2-mut. R172K</p> <p>Revideret kolonnerne Prøve 1 og Prøve 2 i Tabel 11 for C_T IDH1-mut. R132C, ΔC_T IDH1-mut. R132C, C_T IDH2-mut. R172K og ΔC_T IDH2-mut. R172K</p>

Denne side skal være tom

Aftale om begrænset licens til *therascreen* IDH1/2 RQG PCR Kit

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

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

Opdaterede licensbetingelser kan findes på www.qiagen.com.

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

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

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

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

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

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

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

1119896 07-2020 HB-1566-005 © 2020 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

