

Juli 2020

Handbok för *therascreen*[®] IDH1 /2 RGQ PCR Kit



Version 1

För detektion av 12 *IDH1*- och *IDH2*-mutationer i gliom

IVD

För in vitro-diagnostisk användning

För användning med instrumentet Rotor-Gene[®] Q MDx
5plex HRM



REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R5 **MAT**

1119896SV

Innehåll

Avsedd användning	5
Sammanfattning och förklaring	6
Testprincipen	8
Material som medföljer	10
Kitinnehåll	10
Material som behövs men inte medföljer	12
Varningar och försiktighetsåtgärder	14
Säkerhetsinformation	14
Allmänna säkerhetsåtgärder	14
Förvaring och hantering av reagenser	16
Leveransvillkor	16
Förvaring	16
Stabilitet	16
Förvaring och hantering av prover	17
Procedur	18
Extraktion och beredning av DNA	18
Protokoll: Detektion av <i>IDH1/2</i> -mutationer	22
Tolkning av resultat	27
Vattenkontroller	27
Kvalitetskontroll med C_T -värden för kontroller	27
Validering av prov-input	30
Provresultat	30

Felsökningsguide.....	36
Kvalitetskontroll	39
Begränsningar.....	40
Prestandaegenskaper	42
Blankgräns (limit of blank, LOB)	42
Detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)	42
Effekt av DNA-input	44
Repeterbarhet och reproducerbarhet.....	44
Metodjämförelse	47
Referenser.....	50
Symboler	52
Beställningsinformation	54
Dokumentrevisioner.....	57

Avsedd användning

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit är ett in vitro-diagnostiskt test baserat på PCR-teknik som är avsett för kvalitativ detektion av 7 mutationer i *IDH1*-genen och 5 mutationer i *IDH2*-genen samt för direkt identifiering av 3 viktiga mutationer i DNA som extraherats från formalinfixerad, paraffinbäddad (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) mänsklig hjärnvävnad.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit är avsett att användas som hjälp vid klassificering av gliom.

Sammanfattning och förklaring

Mutationer i isocitratdehydrogenas-generna (isocitrate dehydrogenase, IDH), *IDH1* och *IDH2*, förekommer ofta hos vuxna patienter med gliom av WHO-grad (World Health Organization) II och III och med sekundära glioblastom (GBM) av WHO-grad IV. Förutom det diagnostiska värdet associeras förekomst av *IDH1/2*-mutationer med en positiv sjukdomsprognos för gliompatienter (1–13).

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit är en analys för detektion av 12 specifika *IDH1/2*-mutationer: 6 inom kodon 132 i *IDH1*-genen, 5 inom homologiska kodonen 172 i *IDH2* och en inom kodon 100 i *IDH1* (tabell 1). Kitet identifierar även direkt de viktiga mutationerna *IDH1* och *IDH2* som leder till substitutionerna *IDH1* R132H, *IDH1* R132C och *IDH2* R172K.

Tabell 1. Mutationerna IDH1 och IDH2 detekterade med hjälp av *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Gen	Mutation	Basskifte	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 har hämtats från databasen Catalog of Somatic Mutations in Cancer (katalog över somatiska mutationer i cancer) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Testprincipen

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit innehåller reagenser för att utföra 9 separata amplifieringsreaktioner för detektion av 12 mutationer (tabell 1):

- 3 totalamplifieringsreaktioner för kodonerna 132 och 100 i *IDH1*-genen och för kodon 172 i *IDH2*-genen
- 3 mutationsamplifieringsreaktioner för kodonerna 132 och 100 i *IDH1*-genen och för kodon 172 i *IDH2*-genen
- 3 mutationsspecifika amplifieringsreaktioner för mutationerna *IDH1* R132H, *IDH1* R132C och *IDH2* R172K

Total-reaktionsmixar

Total-primer och sökfragmentblandningar (PPM-Total) använder primers och sökfragment för att amplifiera både muterade målsekvenser och vildtyps-målsekvenser (bild 1).

Reaktionsmixar för mutationsdetektion

Primer och sökfragmentblandningar för mutationsdetektion kombinerar primers och sökfragment för att amplifiera både muterade målsekvenser och vildtyps-målsekvenser, plus en oligonukleotid, 3'-blockerad med tillsats av en fosfatgrupp för att förhindra elongering (PCR-klampning), vilket är specifikt för vildtyps-målsekvensen.

När PCR-mallen innehåller vildtyps-sekvensen kommer 3'-fosfat-oligonukleotiden att dominera över PCR-primerbindningen på grund av högre affinitet. Det finns ingen eller liten förlängning av DNA-polymeraset och ingen eller låg amplifiering kan observeras.

Om en muterad sekvens förekommer kommer PCR-primerbindningen att dominera över 3'-fosfat-oligonukleotidbindningen och amplifieringen fortsätter (bild 1).

Reaktionsmixar för mutationsidentifiering

Allelspecifik amplifiering uppnås med ARMS (Amplification Refractory Mutation System) som utnyttjar förmågan hos DNA-polymeras att särskilja en matchning och en felmatchning vid 3'-änden av en PCR-primer.

När PCR-primern är helt matchad fortsätter amplifieringen med full effekt. När 3'-basen inte matchar sker endast bakgrundsamplifiering på låg nivå (bild 1).

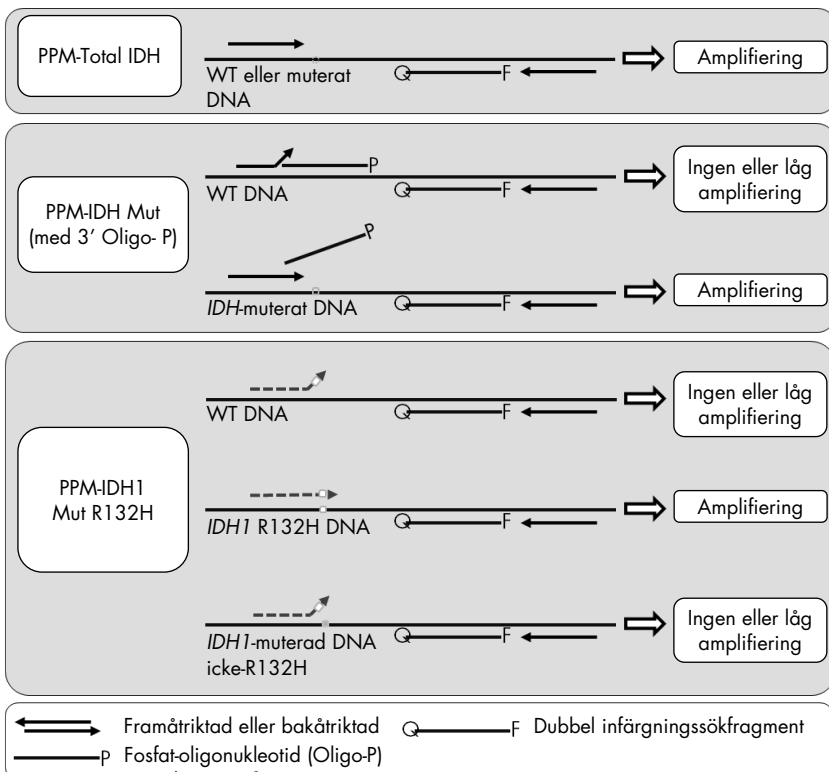


Bild 1. Resultat som erhållits med primer och sökfragmentblandningar i *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit. Samma princip som visats för detektering av *IDH1* R132H gäller för *IDH1* R132C och *IDH2* R172K.

Material som medföljer

Kitinnehåll

<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> (Primer och sökfragmentblandning för detektion av totala <i>IDH1/R132</i>) (vildtyp och muterad)	PPM-Total <i>IDH1/ R132</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Primer och sökfragmentblandning för detektion av totala <i>IDH2/R172</i>) (vildtyp och muterad)	PPM-Total <i>IDH2/ R172</i> 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Primer och sökfragmentblandning för detektion av totala <i>IDH1/R100</i>) (vildtyp och muterad)	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> (Primer och sökfragmentblandning (inklusive Oligo-P) för detektion av muterat <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> (Primer och sökfragmentblandning (inklusive Oligo-P) för detektion av muterat <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> (Primer och sökfragmentblandning (inklusive Oligo-P) för detektion av muterat <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 (Primer och sökfragmentblandning för identifiering av <i>IDH1</i> Mut R132H)	PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x	40 µl

Tabellen fortsätter på nästa sida

Kitets innehåll (fortsättning)

<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 (Primer och sökfragmentblandning för identifiering av <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 (Primer och sökfragmentblandning för identifiering av <i>IDH2</i> Mut R172K)	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
<i>IDH1</i> / <i>IDH2</i> Wild Type Genomic DNA (<i>IDH1</i> / <i>IDH2</i> vildtyp-genomiskt DNA)	<i>IDH1</i> / <i>IDH2</i> WT kontroll	270 µl
<i>IDH1</i> / <i>IDH2</i> Mutated Positive Control (<i>IDH1</i> / <i>IDH2</i> muterad positiv kontroll)	<i>IDH1</i> / <i>IDH2</i> positiv kontroll	270 µl
Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR (Blandning av <i>Taq</i> DNA-polymeras, dNTPs, MgCl ₂ och buffert för qPCR)	qPCR-masterblandning 2x	5 x 900 µl
Nuclease-Free Water (Nukleasfritt vatten)	Nukleasfritt vatten	5 x 525 µl
<i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> handbok (engelska)		1

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Viktigt: Se till att alla instrument som används i den här proceduren har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens anvisningar.

Reagenser (manuell DNA-extraktion)

- DNA-extraktionskit: 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)
- Etanol (96–100 %)
- 1x TE-buffert, pH 8,0

Reagenser (automatisk DNA-extraktion)

- DNA-extraktionskit: 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)
- Etanol (96–100 %)
- 1x TE-buffert, pH 8,0

Förbrukningsartiklar

- Skalpeller
- Nukleasfria aerosolresistenta sterila PCR-pipettspetsar med hydrofobiskt filter
- 2,0 ml eller 1,5 ml nukleasfria rör

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml för Rotor-Gene Q (kat. nr 981103 eller 981106)
- Is

Ytterligare förbrukningsartiklar för automatisk DNA-extraktion

- Sample Prep Cartridges, 8-well (kat. nr 997002)
- 8-Rod Covers (kat. nr 997004)
- Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (kat. nr 990332) och 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)

Utrustning

- Objektglasrack och 2 kompatibla objektglasbad för xylen/Histolemon och etanol
- Mikroliterpipett avsedd för PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Bänkcentrifug med rotor för 0,5 ml/1,5 ml reaktionsrör och mikroplattor (med kapacitet för 13 000–14 000 rpm)
- Bänkstående vortexblandare
- Real-time PCR instrument: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM och tillhörande instrumentspecifikt material
- Programmet Rotor-Gene Q MDx version 2.1.0 eller högre
- Biofotometer
- Termomixer, uppvärmd skakinkubator, värmeblock eller vattenbad som klarar inkubering på 56 °C och 90 °C

Ytterligare utrustning för automatisk rening

- Instrumentet QIASymphony SP
- Programmet QIASymphony SP version 4.0 eller högre

Varningar och försiktighetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS). Dessa är tillgängliga online i PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut säkerhetsdatablad för alla kit och kitkomponenter från QIAGEN.

När det gäller säkerhetsinformation för det reningskit som används, se relevant kithandbok. Säkerhetsinformation om instrument finns i användarhandboken till det aktuella instrumentet.

Allmänna säkerhetsåtgärder

- Testet är avsett för användning med buffrade formalinfixerade, paraffinbäddade (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) vävnadsprover från kirurgisk resektion.
- Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. Prover är potentiellt smittsamma och måste hanteras som smittfarligt material.
- Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.
- Reagenser till *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit är optimalt utspädda. Späd inte ut reagenserna ytterligare då det kan resultera i förlorad prestanda. Använd inte reaktionsvolym (reaktionsmix plus prov) på mindre än 25 µl.
- Alla reagenser som medföljer *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma kit. Byt inte ut reagenser mellan *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-kit, eftersom prestandan då kan påverkas.

- Ytterligare instruktioner om varningar och säkerhetsåtgärder samt fler procedurbeskrivningar finns i användarhandboken till instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Ändring av inkuberingsproceduren och temperaturer kan orsaka felaktiga eller icke överensstämmande data.
- Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Primer och sökfragmentblandningar kan ändras om de utsätts för ljus.
- Iaktta största försiktighet för att förhindra att mixarna kontamineras av syntetiskt kontrollmaterial som finns i positiv kontroll-reagenset.
- Iaktta största försiktighet för att förhindra kontaminering av DNase, vilket kan orsaka försämring av mall-DNA.
- Använd separata för ändamålet avsedda pipetter för iordningställande av reaktionsmixar och tillsats av mall.
- Utför beredning och fördelning av reaktionsmixar i ett område avskilt från området där mall tillsätts.
- Öppna inte instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM förrän körningen har avslutats.
- Öppna inte Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-rören efter att körningen har avslutats.
- Iaktta största försiktighet med betoning på felaktig provinmatning, laddningsfel och pipetteringsfel för att säkerställa korrekt provtestning.

Förvaring och hantering av reagenser

Leveransvillkor

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit levereras på torris. Om någon komponent i *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit inte är frusen vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bipacksedel, handbok eller reagenser i leveransen ska du kontakta någon av QIAGEN teknisk service eller lokala distributörer (se www.qiagen.com).

Förvaring

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit ska vid mottagandet omedelbart förvaras i -30 till -15 °C i en fryskyl med konstant temperatur och skyddat mot ljus.

Stabilitet

Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren är *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten.

När reagenser har öppnats kan de förvaras i originalförpackningen vid -30 till -15 °C fram till angivet utgångsdatum. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Överskrid inte 5 frysning-/upptiningcykler, vilket är det maximalt tillåtna.

Förvaring och hantering av prover

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit ska användas med DNA-prover som extraherats från formalinfixerad paraffinbäddad (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) tumörvävnad tagen från kirurgisk resektion på patienter med hjärncancer. Alla vävnadsprover ska betraktas som potentiellt smittfarliga.

- Vävnadsprover ska fixeras i 4–10 % neutralbuffrat formalin (NBF).
- 10 µm tjocka seriesnitt måste skäras ut från paraffinblocket och placeras på objektglas.
- En utbildad person (t.ex. en patolog) ska bedöma tumörinnehåll och utbredning på ett intilliggande H&E-färgat (Hematoxilyn & Eosin, H&E) snitt. Använd seriesnitt för DNA-extraktion.
- Endast snitt med ≥ 40 % tumörinnehåll är godkända för testning.
- För snitt med < 50 mm² vävnadsområde rekommenderar vi att du bearbetar ett tillräckligt stort antal snitt för att öka det totala vävnadsområdet till minst 50 mm² (100 mm² för automatisk extraktion på QIASymphony SP).
- Märk, hantera och förvara tumörprover, block, objektglas och prover som är redo för extraktion på ett kontrollerat sätt enligt lokala procedurer.
- Förvara FFPE-block och objektglas i rumstemperatur. Objektglas kan förvaras i rumstemperatur i upp till 4 veckor innan DNA-extraktion för användning med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- Genomiskt DNA kan förvaras i 2–8 °C i 1 vecka efter extraktion, eller 8 veckor i -25 till -15 °C.


Procedur

Extraktion och beredning av DNA

Använd QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat. nr 56404) eller QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. nr 937236) för rening av genomiskt DNA från prover som beretts av FFPE-prover från patienter med hjärncancer.

Obs! *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit är endast validerat för användning med QIAamp DNA FFPE Tissue Kit eller med QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Använd inte någon annan produkt för DNA-extraktion.

Använda QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

<p>IAKTTAG FÖRSIKTIGHE</p> 	<p>Läs noggrant igenom följande ändringar som måste tillämpas på QIAamp-protokollet.</p>
---	--

- I avsnittet "Startmaterial" i *handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue* och Förvaring och hantering av prover på sidan 17 i den här handboken finns information om beredning av prover innan deparaffinisering och DNA-extraktion.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit får endast användas manuellt.
- RNase-steget som beskrivs i *handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue* måste utföras.
- Använd inte QIAGEN Deparaffinization Solution. Använd endast xylene-/etanolmetoden för deparaffinisering enligt beskrivningen i "Procedur för deparaffinisering av objektglas vid användning av QIAamp DNA FFPE Tissue Kit" nedan. Xylen kan ersättas med Histolemon (xylensubstitut).
- Nedbrytning av proteinas K måste utföras i 1 timme.


- Proverna måste elueras två gånger i 30 µl elueringsbuffert (Buffer ATE) från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Procedur för deparaffinering av objektglas vid användning av QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

1. Placera objektglasen i ett särskilt objektglasrack.
2. Placera objektglasracket i ett objektglasbad som innehåller xylene eller Histolemon i 2 minuter. Skaka med 2 eller 3 rörelser bakåt och framåt.
3. Placera racket i ett andra objektglasbad som innehåller etanol (96–100 %) i 2 minuter. Skaka med 2 eller 3 rörelser bakåt och framåt.
4. Torka objektglasen i 15–37 °C. Detta tar några minuter.
5. Märk 1,5 ml-mikrocentrifugrör för varje prov och tillsätt 180 µl Buffer ATL (från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) i varje rör.
6. Tillsätt några droppar Buffer ATL på vävnadssektionerna på objektglasen (tillräckligt mycket för att täcka vävnadsytan).
7. Skrapa vävnadsytan med en steril skalpell och lägg ned den bortskrapade vävnaden i mikrocentrifugröret med motsvarande märkning.
8. Tillsätt 20 µl proteinas K (från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) i varje rör och mixa genom att vortexa.
9. Inkubera vid 56 °C i 1 timme.

Fortsätt med inkuberingssteget vid 90 °C i QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-protokollet (steg 12 i *handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue* från juni 2012, sidan 13).

Använda QIASymphony DSP DNA Mini Kit

<p>IAKTTAG FÖRSIKTIGHE</p> 	<p>Läs noggrant följande ändringar som måste tillämpas på QIASymphony SP-protokollarket: Tissue_LC_200_V7_DSP.</p>
---	--

- Se "Förvaring och hantering av prover", sidan 17 för information om beredning av prover innan deparaffinisering och DNA-extraktion.
- RNase-steget som beskrivs i QIASymphony SP-protokollarket måste utföras.
- Använd inte QIAGEN Deparaffinization Solution. Använd endast xylene-/etanolmetoden för deparaffinisering enligt beskrivningen i Procedur för deparaffinisering av objektglas vid användning av QIASymphony DSP DNA Mini Kit nedan. Xylen kan ersättas med Histolemon (xylensubstitut).
- Nedbrytning av proteinas K måste utföras i 1 timme.
- Elueringsvolymen 50 µl måste väljas på pekskärmen.

Procedur för deparaffinisering av objektglas vid användning av QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Utför deparaffinisering enligt följande steg, vilket skiljer sig från protokollet i QIASymphony SP-protokollarket: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Placera objektglasen i ett särskilt objektglasrack.
2. Placera objektglasracket i ett objektglasbad som innehåller xylene eller Histolemon i 2 minuter. Skaka med 2 eller 3 rörelser bakåt och framåt.
3. Placera racket i ett andra objektglasbad som innehåller etanol (96–100 %) i 2 minuter. Skaka med 2 eller 3 rörelser bakåt och framåt.
4. Torka objektglasen i 15–37 °C. Detta tar några minuter.

5. Märk 1,5 ml-mikrocentrifugrör för varje prov och tillsätt 220 µl Buffer ATL i varje rör.
6. Tillsätt några droppar Buffer ATL på vävnadssektionerna på objektglaset (tillräckligt mycket för att täcka vävnadsytan).
7. Skrapa vävnadsytan med en steril skalpell och lägg ned den bortskrapade vävnaden i mikrocentrifugröret med motsvarande märkning.
8. Tillsätt 20 µl proteinas K (från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) i varje rör och mixa genom att vortexa.

Fortsätt med inkuberingssteget vid 56°C i QIAasympHony SP-protokollarket: Protokollat Tissue_IC_200_V7_DSP (steg 12 i protokollet "Deparaffinization using xylene", april 2012). Inkubera vid 56 °C i 1 timme.

Genomiskt DNA

Genomiskt DNA kan förvaras i 2–8 °C i 1 vecka efter extraktion, eller 8 veckor i -25 till -15 °C.

Mängden DNA ska bestämmas genom att mäta den optiska densiteten (OD) för provet vid 260 nm.

Späd DNA till en koncentration på 5 ng/µl i 1x TE-buffert vid pH 8,0.

PCR-reaktionen är optimerad för prover som innehåller 25 ng renat genomiskt DNA.

Protokoll: Detektion av *IDH1/2*-mutationer

Viktigt att tänka på före start

- För att använda *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR Kit på ett optimalt sätt måste proverna grupperas i batcher om 4. Mindre batchstorlekar innebär att färre prover kan testas med *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR Kit.
- Vi rekommenderar att alla prover testas en gång per PCR-körning enligt tabell 2 och med en laddningsblocklayout och rotorkonfiguration enligt tabell 3 och bild 2.

Tabell 2. Antal reaktioner för Rotor-Gene Q MDx-instrument med rotor med 72 rör

Prover	Reaktioner
n DNA-prover	n × 1 reaktioner
2 DNA-kontroller	2 reaktioner: Positiva kontroller och WT-kontroller, var och en testad en gång per PCR-körning
Vattenkontroll	1 reaktion

Tabell 3. Förslag på laddningsblock för ett experiment med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

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

* PC: Positive control (Positiv kontroll).

† WTC: Wild-type control (Vildtypskontroll).

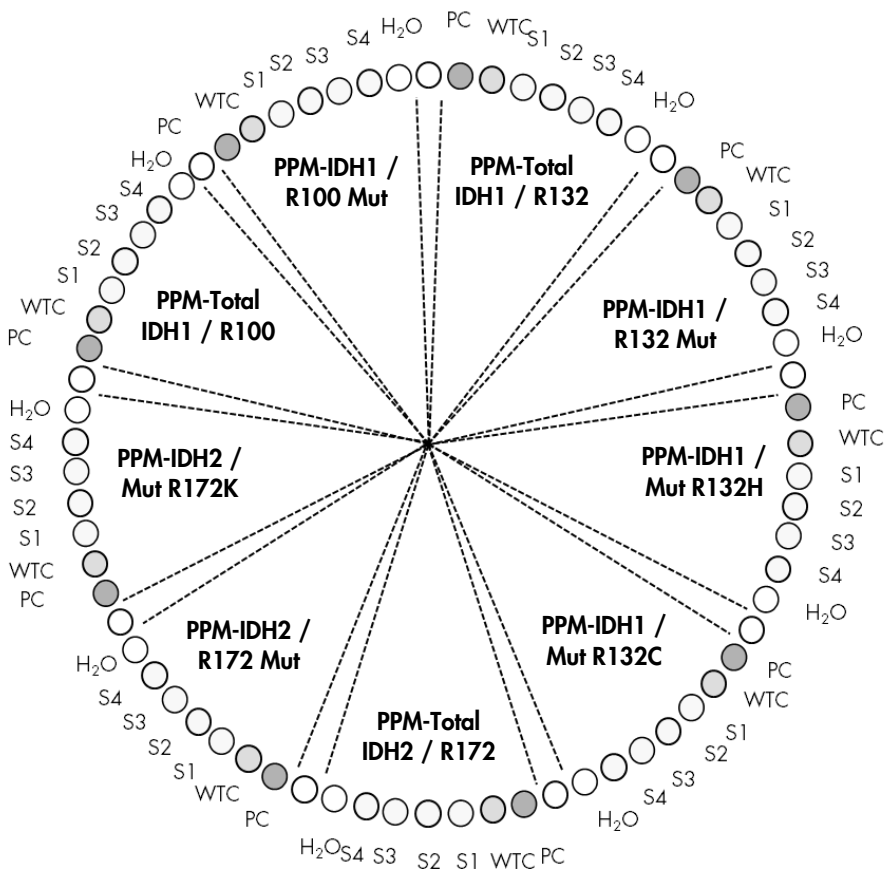


Bild 2. Förslag på rotorkonfiguration för ett experiment med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Viktigt: Se till att alltid placera ett prov i position 1 på rotorn. Annars utför inte instrumentet någon kalibrering, och felaktiga fluorescensdata erhålls.

Procedur

1. Tina alla komponenter som behövs och placera dem på is.
2. Bered följande PCR-mixar enligt det antal prover som ska bearbetas.

Obs! Alla koncentrationer avser den slutliga volymen på reaktionen.

I tabell 4 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensmix, beräknat för att uppnå en slutlig volym på 25 µl. En förmix kan beredas för varje PPM enligt det aktuella antalet reaktioner. Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 4. Beredning av PCR-mixar

Komponent	1 reaktion (µl)	Förmix: 7 + 1 reaktioner (µl)	Slutlig koncentration
qPCR-masterblandning, 2x	12,5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Nukleasfritt vatten	6,5	52	–
Prov eller kontroll† (som ska läggas till i steg 4)	5	5 i varje	–
Total volym	25	25 i varje	–

* Bered 9 förmixar, en med var och en av de PPM:er som medföljer i kitet.

† Positiv kontroll, negativ kontroll eller vattenkontroll.

3. Fördela 20 µl av förmix-lösningen i varje Rotor- Gene-rör (tabell 3).
4. Tillsätt 5 µl av det material som ska kvantifieras (25 ng genomiskt DNA eller kontroll) i det motsvarande röret (total volym 25 µl tabell 3).
5. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
6. Placera rören i adaptern som medföljer instrumentet (bild 2).
Obs! Onvända positioner måste fyllas med tomma rör.
7. Ladda den fulla adaptern i instrumentet Rotor-Gene Q MDx.
8. Programmera instrumentet Rotor-Gene Q MDx med termocyklingsprogrammet enligt tabell 5.

Tabell 5. Temperaturprofil

Hold (Håll)	Temperatur: 95 °C Tid: 10 min
Cycling (Cyklning)	40 gånger 95 °C i 15 s 60 °C i 60 s med hämtning av FAM™-fluorescens i kanalen Green: Single (Enskild)

9. Klicka på **Gain Optimisation** (Optimering av förstärkning) i dialogrutan New Run Wizard (Guide för ny körning) för att öppna dialogrutan Auto-Gain Optimisation Setup (Ställ in automatisk optimering av förstärkning). Ställ in intervallet för kanalen Green från **2Fl** för **Min Reading** (Min. avläsning) till **10Fl** för **Max Reading** (Max. avläsning).
10. Markera kryssrutan **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Utför optimering före första hämtning) och stäng dialogrutan Auto-Gain Optimisation Setup (Ställ in automatisk optimering av förstärkning).
11. Starta termocyklingsprogrammet.
12. Utför följande när termocyklingen har slutförts.
 - 12a. Välj **Options** (Alternativ) > **Crop Start Cycles** (Ta bort startcykler). Ta bort data före cykel **10** för att inte få med eventuella falska ökningar.
 - 12b. Välj **Analysis** (Analys) > **Cycling A. Green from 10** (Cycling A. Green från 10), vilket indikeras i rapporten som left threshold = 10.00 (vänster tröskelvärde = 10,00).
 - 12c. Välj **Dynamic Tube** (Dynamiskt rör) som normaliseringsmetod och **Slope correct** (Korrigera lutning) för att korrigera lutningen på bruset.
 - 12d. Ställ in **Outlier Removal** (Ta bort extremvärde) på **0%** (0 %) (motsvarande NTC-tröskelvärdet).
 - 12e. Ställ in **Reaction Efficiency Threshold** (Tröskelvärde för reaktionseffektivitet) på att vara inaktiverat.
 - 12f. Definiera tröskelvärdet vid **0.03 (0,03)**.
 - 12g. Ställ in diagrammet på linjär skala.
 - 12h. Välj **Digital Filter** (Digitalt filter): **Light (Ljus)**.

Tolkning av resultat

Vattenkontroller

Vattenkontroller (kontroller utan mall) ska ge C_T -värden på noll för alla primer och sökfragmentblandningar.

Om ett positivt C_T -värde erhålls med en vattenkontroll beror detta på en korskontaminering. Se "Felsökningsguide", sida 36 för att hitta en lösning.

Kvalitetskontroll med C_T -värden för kontroller

Vildtyp-kontrollen *IDH1/2* (wild-type control, WTC) och den muterade positiva kontrollen *IDH1/2* (Mut-PC) tillåter validering av experimentet.

- Om det inte finns något C_T -värde klassas kontrollen som mutationsnegativ för respektive detektionsanalys.
- Om C_T -värden detekteras, beräkna ΔC_T enligt följande för varje kontroll

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

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

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

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

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

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

Kontroller klassificeras som mutationspositiva om ΔC_T -värdena är mindre än eller lika med de respektive ΔC_T -cutoff-värden som listas i tabell 6. Om ΔC_T -värdet är högre än cutoff, klassificeras kontrollen som mutationsnegativ för den undersökta mutationsanalysen.

Tabell 6. Cutoff-värden för varje mutationsanalys

Mutationsanalys	Cutoff (ΔC_t)
IDH1/R132 Mut	5,34
IDH2/R172 Mut	6,42
IDH1/R100 Mut	4,65
IDH1 Mut R132H	6,87
IDH1 Mut R132C	7,14
IDH2 Mut R172K	8,49

- Vildtyp-kontrollen *IDH1/2* måste detekteras som mutationsnegativ för varje mutationsanalys (tabell 7).
- Den muterade positiva kontrollen *IDH1/2* måste detekteras som mutationspositiv för varje mutationsanalys (tabell 7).

Hela experimentet avvisas om inte båda dessa villkor uppfylls.

Tabell 7. Exempel på körningsvalidering på kontroller

Värde	Vatten (NTC)	IDH1/IDH2 WT Control	IDH1/IDH2 positiv kontroll
C_T Total IDH1/R132	Ej detekterat	25,45	23,95
C_T IDH1/R132 Mut	Ej detekterat	34,32	25,76
ΔC_T IDH1/R132 Mut	Ej detekterat	8,87	1,81
C_T Total IDH2/R172	Ej detekterat	25,42	24,93
C_T IDH2/R172 Mut	Ej detekterat	34,36	26,36
ΔC_T IDH2/R172 Mut	Ej detekterat	8,94	1,43
C_T Total IDH1/R100	Ej detekterat	26,30	24,69
C_T IDH1/R100 Mut	Ej detekterat	33,04	26,39
ΔC_T IDH1/R100 Mut	Ej detekterat	6,74	1,70
C_T IDH1 Mut R132H	Ej detekterat	35,20	26,48
ΔC_T IDH1 Mut R132H	Ej detekterat	9,75	2,53
C_T IDH1 Mut R132C	Ej detekterat	37,16	27,07
ΔC_T IDH1 Mut R132C	Ej detekterat	11,71	3,12
C_T IDH2 Mut R172K	Ej detekterat	Inte detekterat	27,97
ΔC_T IDH2 Mut R172K	Ej detekterat	Ej relevant	3,04

Validering av prov-input

Prov-input måste valideras innan tolkning.

Det C_T -värde som erhålls för ett prov med respektive PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ och $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) måste vara lägre än 32,00. $C_{T \text{ Total}}$ -värden $\geq 32,00$ beror på dålig kvalitet hos DNA. Provet måste testas på nytt. Om mängden DNA fortfarande är otillräcklig extraherar du mer tumörvävnad, i förekommande fall (se "Felsökningsguide" på sidan 36).

Provresultat

IDH1/2-mutationsdetektion

För varje prov beräknas ΔC_T -värdena som erhålls med respektive mutationsdetektionsanalys (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut) enligt nedan.

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

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

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

Om det inte finns något C_T -värde för en mutationsdetektionsanalys, måste provet klassificeras som mutationsnegativt för den undersökta mutationen.

Prover klassificeras som mutationspositiva om ΔC_T -värdet är mindre än eller lika med ΔC_T -cutoff-värdet för respektive mutationsdetektionsanalys som listas i tabell 8.

Tabell 8. Cutoff-värden för varje mutationsdetektionsanalys

Mutationsanalys	Cutoff (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5,34
IDH2/R172 Mut	6,42
IDH1/R100 Mut	4,65

IDH1/2-mutationsidentifiering

För varje prov beräknas ΔC_T -värdena som erhålls med respektive mutationsidentifieringsanalys (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K) enligt nedan.

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

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

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

Om det inte finns något C_T -värde för en mutationsidentifieringsanalys, måste provet klassificeras som mutationsnegativt.

Provmutationen identifieras om ΔC_T -värdet är mindre än eller lika med ΔC_T -cutoff-värdet för respektive mutationsidentifieringsanalys som listas i tabell 9. Exempel på ΔC_T -tolkningar visas i tabell 10 och tabell 11.

Tabell 9. Cutoff-värden för varje mutationsidentifieringsanalys

Mutationsanalys	Cutoff (ΔC_T)
IDH1 Mut R132H	6,87
IDH1 Mut R132C	7,14
IDH2 Mut R172K	8,49

Tabell 10. Exempel på IDH1/2-mutationsdetektion

Värde	Prov 1	Prov 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
Mutationsdetektion	Ingen mutation detekterad	R132-mutation detekterad

Tabell 11. Exempel på IDH1/2-mutationsidentifiering

Värde	Prov 1	Prov 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	Inte detekterat
ΔC_T IDH1 Mut R132C	11,55	Ej relevant
C_T Total IDH2/R172	26,79	25,79
C_T IDH2 Mut R172K	Inte detekterat	Inte detekterat
ΔC_T IDH2 Mut R172K	Ej relevant	Ej relevant
Mutationsidentifiering	Ingen mutation detekterad	Mutation detekterad för R132H

Tolkning av *IDH1/2*-mutationer

Proceduren som används för att tilldela mutationstypen *IDH1/2* till prover som är positiva för en *IDH1/2*-mutation visas i tabell 12. Ett exempel på tolkning visas i tabell 13.

Tabell 12. Tolkningsguide

		Mutationsidentifiering			
		<i>IDH1</i> Mut R132H detekterad	<i>IDH1</i> Mut R132C detekterad	<i>IDH2</i> Mut R172K detekterad	Ingen mutation detekterad
Mutationsdetektion	R132-mutation detekterad	R132H-mutation detekterad	R132C-mutation detekterad	–	R132-mutation men varken R132H eller R132C
	R172-mutation detekterad	–	–	R172K-mutation detekterad	R172-mutation men inte R172K
	R100-mutation detekterad	–	–	–	R100
	Ingen mutation detekterad	Lågt innehåll av mutation R132H detekterat (mellan 1 % och 2 %)*	Lågt innehåll av mutation R132C detekterat (mellan 1 % och 4%)*	Lågt innehåll av mutation R172K detekterat (cirka 1 %)*	Ingen mutation detekterad

* Dessa fall kan uppstå vid enstaka tillfällen, och alla prover och tekniska acceptanskriterier ska då kontrolleras, i synnerhet tumörcellsinnehållet. Om alla kriterier är uppfyllda ska provet testas om.

Tabell 13. Exempel på rapportering om och tolkning av *IDH1/2*-mutationen

	Prov 1	Prov 2
Mutationsdetektion	Ingen mutation detekterad	R132-mutation detekterad
Mutationsidentifiering	Ingen mutation detekterad	Mutation detekterad för R132H
Tolkning av resultat	Ingen mutation detekterad eller identifierad	R132H muterat

Obs! Om ett prov har 2 eller fler ΔC_T -värden som är mindre än eller lika med ΔC_T cutoff-värdena, så tilldelas mutationsstatus till den mutation som har störst differens mellan cutoff-värdet och erhållet ΔC_T -värde. Se exempel i tabell 14.

Tabell 14. Exempel på tolkningar vid flera positiva resultat

	Prov 3	Prov 4
ΔC_T <small>IDH1/R132 Mut</small>	1,24	5,24
ΔC_T cutoff <small>IDH1/R132 Mut</small>	5,34	5,34
$(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ <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
$(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ <small>IDH2/R172 Mut</small>	1,10	0,47
Tolkning av resultat	R132 muterat	R172 muterat

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. Det finns mer information på www.qiagen.com.

Kommentarer och förslag på åtgärd

Tilltäppt kolumn under DNA-extraktion

- | | |
|-----------------------|---|
| Ofullständig lysering | Upprepa centrifugering.

Återstående lysat kan överföras till en ny kolumn.

Upprepa extraktionskörningen med mindre FFPE-vävnad. |
|-----------------------|---|

Otillräckligt DNA i extraktionseluatet

- | | |
|----------------------------------|--|
| Otillräckligt FFPE-vävnadsområde | Upprepa extraktionskörningen med fler FFPE-vävnadssnitt. |
|----------------------------------|--|

IDH1/2 WT-kontroll inte detekterad

- | | |
|---|---|
| a) Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser; felvända rör eller brunnar | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.

Upprepa PCR-körningen. |
| b) Felaktig förvaring av kitkomponenter | Förvara <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit i -30 till -15 °C och förvara primer och sökfragmentblandningar i skydd mot ljus.
Se "Förvaring och hantering av reagenser", sidan 16.

Överskrid inte 5 frysnings-/upptiningscykler, vilket är det maximalt tillåtna. |
| c) Utgångsdatum för <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit har passerat | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit om det behövs. |

IDH1/2 positiv kontroll inte detekterad

- a) Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser; felvända rör eller brunnar
Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.
Upprepa PCR-körningen.
- b) Felaktig förvaring av kitkomponenter
Förvara *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit i -30 till -15 °C och förvara primer och sökfragmentblandningar i skydd mot ljus.
Se "Förvaring och hantering av reagenser", sidan 16.

Överskrid inte 5 frysnings-/upptiningscykler, vilket är det maximalt tillåtna.
- c) Utgångsdatum för *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit har passerat
Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit om det behövs.

Ingen signal, inklusive ingen signal för kontroller

- a) Inget reaktionsrör i position 1 på instrumentet Rotor-Gene Q MDx
Se till att alltid placera ett prov i position 1 på rotorn. Annars utför inte instrumentet någon kalibrering, och felaktiga fluorescensdata erhålls.
- b) Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser; felvända rör eller brunnar
Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.
Upprepa PCR-körningen.
- c) Felaktig förvaring av kitkomponenter
Förvara *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit i -30 till -15 °C och förvara primer och sökfragmentblandningar i skydd mot ljus.
Se "Förvaring och hantering av reagenser", sidan 16.

Överskrid inte 5 frysnings-/upptiningscykler, vilket är det maximalt tillåtna.

- d) Utgångsdatum för *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit har passerat
Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit om det behövs.
- e) Felaktig detektionskanal vald
Ställ in detektionskanalen på Cycling Green eller 530 nm/640 nm.
- f) Inget datainsamlingsprogram
Kontrollera cyklingsprogrammet. Se tabell 5, sidan 26.
Välj hämtningsläget **Single** (enskild) i slutet av varje hybridiseringssegment i PCR-programmet.

Fluorescensintensiteten varierar

Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser; felvända rör eller brunnar

Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.
Upprepa PCR-körningen.

Fluorescensintensiteten är för låg

- a) Felaktig förvaring av kitkomponenter
Förvara *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit i -30 till -15 °C och förvara primer och sökfragmentblandningar i skydd mot ljus.
Se "Förvaring och hantering av reagenser", sidan 16.
Överskrid inte 5 frysnings-/upptiningscykler, vilket är det maximalt tillåtna.
- b) Utgångsdatum för *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit har passerat
Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit om det behövs.
- c) Mycket låg mängd mål-DNA
Kontrollera alltid DNA-koncentrationen innan start. Se "Extraktion och beredning av DNA", sidan 18.

Negativ kontroll (H₂O) ger ett positivt resultat

Korskontaminering,
reagenskontaminering,
instrumentfel, felvänd brunn eller
kapillärrörsinversion, eller
försämring av sökfragment

Byt ut alla kritiska reagenser eller använd ett nytt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika Carryover av kontaminering.

Förvara primer och sökfragmentblandningar i skydd mot ljus.

Leta efter falskt positiva resultat på fluorescenskurvor.

Kontrollera iordningställandet av reaktionen. Se "Protokoll: Detektion av IDH1/2-mutationer", sidan 22.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem. Analyscertifikat finns tillgängliga på begäran på www.qiagen.com/support/.

Begränsningar

Det här kitet är avsett för professionell användning.

Produkten är endast avsedd att användas av personal som fått särskild utbildning i molekylärbiologiteknik och är väl förtrogen med detta område.

Kitet ska användas i enlighet med anvisningarna i denna handbok, i kombination med ett validerat instrument som omnämns i "Material som behövs men inte medföljer", sida 12.

Var uppmärksam på de utgångsdatum som anges på förpackningen och på etiketterna till alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit är endast validerat för formalinfixerad, paraffinbäddad hjärnvävnad.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit är endast validerat för användning med QIAamp DNA FFPE Tissue Kit eller med QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Endast Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (för PCR) och QIASymphony SP (för provberedning) har validerats.

All användning av produkten tillsammans med andra märken och/eller ändring av komponenterna gör att QIAGENS garanti upphör att gälla

Det är användarens ansvar att validera systemegenskaperna för alla de procedurer som används i laboratoriet som inte ingår i QIAGENS egenskapsstudier.

Testet är utformat för att detektera 7 mutationer i kodonerna 132 och 100 i *IDH1*-genen och 5 mutationer i kodon 172 i *IDH2*-genen. Prover med resultat som rapporteras som "ingen mutation detekterad" kan innehålla *IDH1*- eller *IDH2*-mutationer som inte detekteras av analysen.

Detektion av mutationer beror på provets integritet, tumörinnehållet samt mängden amplifierbart DNA som finns i provet.

Diagnostiska resultat som genereras av produkten måste tolkas med hänsyn till resultat från alla relevanta kliniska studier eller laboratoriestudier.

Prestandaegenskaper

Blankgräns (limit of blank, LOB)

Blankgräns (limit of blank, LOB) fastställdes (enligt riktlinjen CLSI/NCCLS EP17-A; 14) på negativa prover (FFPE-prov från normal hjärnvävnad, 8 prover, 64 mätningar/lot, 2 loter).

LOB-resultaten visas i tabell 15.

Tabell 15. Blankgräns (limit of blank, LOB)

Analys	LOB	Slutlig LOB
R132 Mut	Validering lot 1: 6,57 Validering lot 2: 6,32	6,32
R132H Mut	Validering lot 1: 7,91 Validering lot 2: 8,22	7,91
R132C Mut	Validering lot 1: 8,04 Validering lot 2: 8,20	8,04
R172 Mut	Validering lot 1: 7,74 Validering lot 2: 7,59	7,59
R172K Mut	Validering lot 1: 9,93 Validering lot 2: 10,58	9,93
R100 Mut	Validering lot 1: 6,52 Validering lot 2: 5,19	5,17

Detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)

Detektionsgräns (LOD eller analytisk sensitivitet) fastställdes baserat på den "precision profile approach" (precisionsprofil) som beskrivs i riktlinjen CLSI/NCCLS EP17-A (14). Fem lågpositiva prover (plasmid-DNA spikat i vildtyp-DNA från gliom) användes per mutation (30 till 110 mätningar per mutationstyp och mutationsprocent).

LOD-resultaten visas i tabell 16.

Tabell 16. Detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)

Analys	Mutationer	LOD	Analysens cutoff-värde	Känslighet (%)
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 detekteras om ΔC_T är mindre än eller lika med LOD.

Effekt av DNA-input

DNA extraherades från 4 olika gliomtumorprover: 2 med vildtyp *IDH1/2* och 2 som bar på mutationen *IDH1* R132H (395G>A).

Tre olika DNA-mängder (inklusive den rekommenderade för protokollet) testades för att utvärdera inverkan av DNA-input på kvalitativa resultat. Resultaten visade att DNA-input inte hade någon inverkan på kvalitativa resultat. Däremot observerades tekniska fel ($C_{T \text{ Total}}$ QC-fel) för DNA-input som var lägre än rekommenderad input (< 25 ng DNA). Följdaktligen rekommenderas en input på 25 ng DNA i en volym på 5 μ l för att köra testet.

Repeterbarhet och reproducerbarhet

Precisionsstudien utfördes på 4 olika prover (vildtyp-DNA från gliom spikat med plasmid-DNA, representativt för vildtyp-(Wild-Type, WT), mutant- och cutoff-prov) och testades 40 gånger i duplikat ($n = 80$ mätningar).

Standardavvikelser (SD) och variationskoefficienter (Coefficient of Variation, CV) visas i tabell 17.

Tabell 17. Precisionsresultat

Analys	Prov	Genomsnittlig ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	$CV_{Total} (\%)^\ddagger$	Korrekta bestämningar
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: Repeterbarhet.

† Körning: Reproducerbarhet mellan körningar.

‡ Total: Total precision (inklusive mellan instrument, mellan användare och mellan loter).

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabell 17. Precisionsresultat (fortsätter)

Analys	Prov	Genomsnittlig ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	$CV_{Total} (\%)^\ddagger$	Korrekt bestämningar
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: Repeterbarhet.

† Körning: Reproducerbarhet mellan körningar.

‡ Total: Total precision (inklusive mellan instrument, mellan användare och mellan loter).

Metodjämförelse

Jämförelse med immunohistokemi för detektion av *IDH1/R132H*.

En studie genomfördes för att påvisa överensstämmelsen mellan mutationsstatus som bedömts med *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* respektive IHC (anti-human *IDH1R132H* antikroppsklon H09, DIANOVA).

Totalt 103 kliniska prover från gliom valdes ut. Det äldsta blocket var 10 år.

Alla prover klarade kvalitetskontrollerna för både *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* och IHC.

Resultaten visade en positiv överensstämmelse i procent på 100 %, en negativ överensstämmelse i procent på 98 % och en total överensstämmelse i procent på 99 % (tabell 18).

Tabell 18. Analys av överensstämmelse mellan *therascreen* RGQ PCR Kit och IHC

Mått på överensstämmelse	Frekvens (%)	95 % konfidensintervall
PPA	45/45 (100 %)	[92;100]
NPA	57/58 (98 %)	[91;100]
OA	102/103 (99%)	[96;100]

Jämförelse med bidirektionell sekvensering

En studie genomfördes för att påvisa överensstämmelsen mellan mutationsstatus som bedömts med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit respektive bidirektionell sekvensering.

Totalt 103 kliniska tumörprover från gliompatienter valdes ut. Det äldsta blocket var 10 år.

Samtliga 103 prover klarade kvalitetskontrollerna för *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, och 101 prover återgav resultat för bidirektionell sekvensering.

Resultaten visade en positiv överensstämmelse i procent (positive percentage agreement, PPA) på 100 %, en negativ överensstämmelse i procent (negative percentage agreement, NPA) på 92 % och en total överensstämmelse i procent (overall agreement, OA) på 96 % (tabell 19 och 20).

Tabell 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit jämfört med bidirektionell sekvensering

		Bidirektionell Sanger-sekvensering				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT
# <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172†	0	0	0	0	1
	WT	0	0	0	0	47

* R132 betyder att provet visade sig innehålla en R132-mutation men varken R132H eller R132C.

† R172 betyder att provet visade sig innehålla en R172-mutation men inte R172K.

Tabell 20. Analys av överensstämmelse med bidirektionell sekvensering

Mått på överensstämmelse	Frekvens (%)	95 % konfidensintervall
PPA	50/50 (100 %)	[93;100]
NPA	47/51 (92%)	[81;97]
OA	97/101 (96%)	[90;98]

Referenser

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

I nedanstående tabell beskrivs de symboler som kan förekomma i märkningen eller i detta dokument.



<N>

Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner



Utgångsdatum



In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer (dvs. komponentetikett)



Komponenter (dvs. en lista över vad som ingår)



Innehåller (innehåll)



Antal (dvs. vialer, flaskor)

Rn

R betyder revidering av handboken och n är revisionsnumret



GS1-artikelnummer



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Läs bruksanvisningen innan användning



lakttag försiktighet

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat. nr
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	För 20 reaktioner: 9 primer och sökfragmentblandningar, WT-kontroll, positiv kontroll, masterblandning, nukleasfritt vatten	873011
Rotor-Gene Q MDx och tillbehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cykler med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), bärbar dator, program och tillbehör: inkluderar 1 års garanti på delar och arbete; installation och utbildning ingår inte	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanalspipett i 72 x 0,1 ml rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör och lock för 10 000 reaktioner	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – för rening av genomiskt DNA från paraffinbäddad vävnad		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA förberedelser: 50 QIAamp MinElute® Columns, proteinas K, buffertar, Collection Tubes (2 ml)	56404

Produkt	Innehåll	Kat. nr
QIASymphony DSP DNA Mini Kit – för automatiserad rening av DNA från 1–96 prover		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	För 192 beredningar (200 µl i varje): inkluderar 2 reagenskassetter och enzymställ och tillbehör	937236
QIASymphony SP och tillbehör		
QIASymphony SP System	QIASymphony provberedningsmodul: inkluderar installation och utbildning, 1 års garanti på delar och arbete	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony provberedningsmodul: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-brunnars provberedningskassetter för användning med QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers för användning med QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Engångsfilterspetsar, i ställ (8 x 128). För användning med instrumenten QIAcube och QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Engångsfilterspetsar, i ställ (8 x 128). För användning med QIASymphony SP/AS-instrument	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Icke-sterila polypropylenrör (0,85 ml maximal kapacitet, mindre än 0,7 ml förvaringskapacitet, 0,4 ml elueringskapacitet); 2304 i ställ med 96, inkluderar lockremsor	19588
Reagenser		
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 enheter/ml, lösning)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml lyseringsbuffert för 1000 beredningar	19076

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN-kithandbok eller -bruksanvisning. Handböcker och bruksanvisningar till QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN teknisk service eller din lokala återförsäljare.

Dokumentrevisioner

Datum	Ändringar
R5 juli 2020	<p>Avsnittet tolkning av resultat reviderades och information om klassificering av kontroller och prover beroende på Ct-värde-detektion lades till</p> <p>Reviderade IDH1/IDH2 WT kontrollkolumn i tabell 7 för C_T IDH Mut R172K och ΔC_T IDH2 Mut R172K</p> <p>Reviderade kolumnerna prov 1 och prov 2 i tabell 11 för C_T IDH1 Mut R132C, ΔC_T IDH1 Mut R132C, C_T IDH2 Mut R172K, och ΔC_T IDH2 Mut R172K</p>

Denna sida har med avsikt lämnats tom

Avtal om begränsad licens för *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit, förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Den här produkten är avsedd för in vitro-diagnostisk användning. QIAGEN-produkter får inte säljas vidare, modifieras för återförsäljning eller användas för att tillverka kommersiella produkter utan föregående skriftligt medgivande från QIAGEN.

Informationen i det här dokumentet kan komma att ändras utan föregående meddelande. QIAGEN ansvarar inte för eventuella fel i detta dokument. Det här dokumentet förväntas vara fullständigt och korrekt vid tidpunkten för publicering. Under inga omständigheter ska QIAGEN hållas ansvarigt för oavsiktliga, särskilda, multipla eller påföljande skador som uppstått i samband med eller genom användning av det här dokumentet.

QIAGENS produkter uppfyller garanterat sina angivna specifikationer. QIAGENS enda skyldighet och kundens enda rättighet är begränsad till ersättande av produkter kostnadsfritt om produkterna inte fungerar som utlovat.

Köpet av den här produkten ger användaren rätt att utföra diagnostiska analyser för human in vitro-diagnostik. Inget allmänt patent eller licens av något slag förutom den här specifika rättigheten ingår i köpet.

IDH1/2-mutationer och användningen av dessa skyddas av patenträttigheter, inklusive europeiska patentansökningar EP2326735 och EP2546365, amerikanska patentansökningar US2011229479 och US2012202207 och utländska motparter.

Köpet av den här produkten medför inga rättigheter till användning vid kliniska prövningar för läkemedel innehållande *IDH1/2*. QIAGEN utvecklar specifika licensprogram för sådana användningsområden. Kontakta gärna vår juridiska avdelning på idllicenses@qiagen.com.

Varumärken: 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, med ensamrätt.

