

юли 2020 г.

Наръчник за *therascreen*[®] IDH1/2 RGQ PCR Kit



Версия 1

За откриване на мутации *12 IDH1* и *IDH2* в глиома

IVD

За инвитро диагностика

За употреба с апарат Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ГЕРМАНИЯ

R5 **MAT**

1119896BG

Съдържание

Предназначение	5
Кратко изложение и обяснение	6
Принцип на процедурата	8
Предоставени материали	11
Съдържание на набора	11
Необходими, но непредоставени материали	13
Предупреждения и предпазни мерки	15
Информация за безопасност	15
Общи предпазни мерки	15
Съхранение и боравене с реактиви	17
Условия за транспортиране	17
Съхранение	17
Стабилност	17
Съхранение и работа с проби	18
Процедура	19
Извличане на ДНК и подготовка	19
Протокол: Откриване на мутации в <i>IDH1/2</i>	23
Интерпретиране на резултатите	29
Водни контроли	29
Контрол на качеството с използване на стойности C_t на контроли	29
Валидиране на въведения обем аликвотна част	32
Резултати за аликвотна част	32

Ръководство за отстраняване на проблеми	38
Контрол на качеството	41
Ограничения	42
Работни характеристики	44
Граница на празна проба (LOB)	44
Граница на откриване (LOD)	44
Въздействие на входящата ДНК	46
Повторяемост и възпроизводимост	46
Сравняване на методи.....	49
Препратки.....	52
Символи	54
Информация за поръчка	56
Хронология на редакциите на документа	59

Предназначение

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit е инвитро диагностичен тест, базиран на PCR технология, предназначен за качествено откриване на 7 мутации на гена *IDH1* и 5 мутации на гена *IDH2*, както и за директна идентификация на 3 основни мутации, в ДНК, извлечена от фиксирана с формалин, вградена в парафин (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) човешка мозъчна тъкан.

Наборът *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit е предназначен да се използва като помощно средство при класифициране на глиоми.

Кратко изложение и обяснение

Мутациите в гените *IDH1* и *IDH2* на изоцитрат дехидрогеназа (Isocitrate Dehydrogenase, IDH), са чести при възрастни глиоми степен II и III на Световната здравна организация (World Health Organization, WHO) и вторични глиобластоми (Glioblastomas, GBM) степен IV на WHO. В допълнение към тяхната диагностична стойност, наличието на мутации *IDH1/2* е свързано с положителна прогноза на пациентите с глиом (1-13).

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit е анализ за откриване на 12 специфични *IDH1/2* мутации: 6 в кодон 132 на гена *IDH1*, 5 в хомоложен кодон 172 на *IDH2* и 1 в кодон 100 на *IDH1* (Таблица 1). Освен това наборът директно идентифицира основните мутации *IDH1* и *IDH2*, водещи до замествания *IDH1* R132H, *IDH1* R132C и *IDH2* R172K.

Таблица 1. Мутации IDH1 и IDH2, открити с помощта на *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Ген	Мутация	Промяна на базата	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

* идентификационните номера на COSMIC са взети от Catalog of Somatic Mutations in Cancer (Каталога на соматичните мутации при рака) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Принцип на процедурата

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit осигурява реактиви за извършване на 9 отделни амплификационни реакции за откриване на 12 мутации (Таблица 1):

- 3 общи реакции на амплификация на кодони 132 и 100 на гена *IDH1* и на кодон 172 на гена *IDH2*
- 3 реакции на амплификация на мутация на кодони 132 и 100 на гена *IDH1* и на кодон 172 на гена *IDH2*
- 3 специфични за мутацията реакции на амплификация на *IDH1* R132H, *IDH1* R132C и *IDH2* R172K мутации

Общо реакционни смеси

Общите смеси от праймери и проба (PPM-общо) използват праймери и проба за амплификация както на мутирани, така и на див тип целеви последователности (Фигура 1).

Реакционни смеси за откриване на мутации

Смесите праймери и проба за откриване на мутации, комбинират праймери и проба, за амплификация както на мутирани, така и на див тип целеви последователности, плюс олигонуклеотид, 3' блокиран с добавка на фосфатна група за предотвратяване на удължаване на праймера (PCR клампиране), специфично за див тип целева последователност.

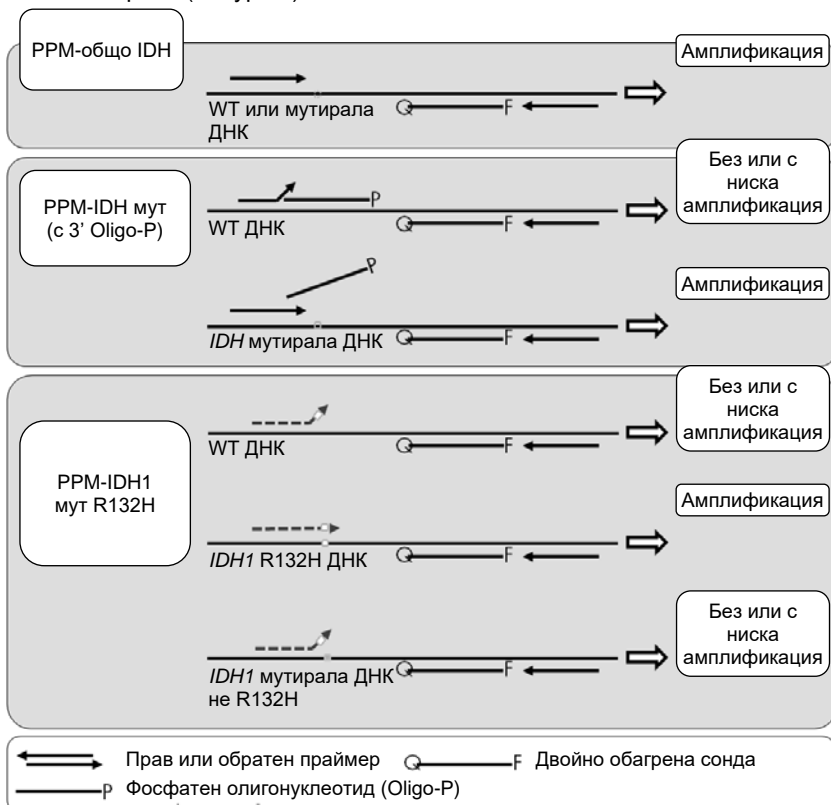
Когато PCR еталонът съдържа див тип последователност, 3'-фосфатният олигонуклеотид ще доминира над свързването на PCR праймера, вследствие на по-високия афинитет. Няма или има малко удължаване на ДНК полимеразата и не се наблюдава или има ниска амплификация.

Когато присъства мутирала последователност, свързването на PCR праймера ще доминира над свързването на 3-фосфатния олигонуклеотид и амплификацията ще продължи (Фигура 1).

Реакционни смеси за идентифициране на мутации

Чрез ARMS (амплификационна система за идентификация на мутации) се постига амплификация, специфична за алела, която използва способността на ДНК полимеразата за разграничаване на съответстваща и несъответстваща база в 3' край на PCR праймера.

Когато PCR праймерът е напълно съвпадащ, амплификацията протича с пълна ефективност. Когато 3' базата е с несъвпадение, се осъществява само амплификация с ниско ниво на фона (Фигура 1).



Фигура 1. Резултати, получени със смесени праймери и проба в *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*. Същият принцип, демонстриран за откриване на *IDH1 R132H*, се прилага за *IDH1 R132C* и *IDH2 R172K*.

Предоставени материали

Съдържание на набора

<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Каталожен номер		873011
Брой реакции		20
Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> (Смес на праймери и проба за откриване на общо <i>IDH1/R132</i> (див тип и мутирал))	PPM-общо <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Смес на праймери и проба за откриване на общо <i>IDH2/R172</i> (див тип и мутирал))	PPM-общо <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Смес на праймери и проба за откриване на общо <i>IDH1/R100</i> (див тип и мутирал))	PPM-общо <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R132</i> (Смес на праймери и проба (включително олиго-P) за откриване на мутирал <i>IDH1/R132</i>)	PPM- <i>IDH1/R132</i> мут 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH2/R172</i> (Смес на праймери и проба (включително олиго-P) за откриване на мутирал <i>IDH2/R172</i>)	PPM- <i>IDH2/R172</i> мут 25x	40 µl
Primers and Probe mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R100</i> (Смес на праймери и проба (включително олиго-P) за откриване на мутирал <i>IDH1/R100</i>)	PPM- <i>IDH1/R100</i> мут 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> мут R132H (Смес на праймери и проба за идентификация на <i>IDH1</i> мут R132H)	PPM- <i>IDH1</i> мут R132H 25x	40 µl

Таблицата продължава на следващата страница

Съдържание на набора (продължение)

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Каталожен номер		873011
Брой реакции		20
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> мут R132C (Смес на праймери и проба за идентификация на <i>IDH1</i> мут R132C)	PPM-IDH1 мут R132C 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH2</i> мут R172K (Смес на праймери и проба за идентификация на <i>IDH2</i> мут R172K)	PPM-IDH2 мут R172K 25x	40 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Wild Type Genomic DNA (<i>IDH1/IDH2</i> див тип геномна ДНК)	<i>IDH1/IDH2</i> WT контрола	270 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Mutated Positive Control (<i>IDH1/IDH2</i> мутирал положителна контрола)	<i>IDH1/ IDH2</i> положителна контрола	270 µl
Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR (Смес от <i>Taq</i> ДНК полимераза, dNTPs, MgCl ₂ и буфер за qPCR)	qPCR основна смес 2x	5 × 900 µl
Nuclease-Free Water (Вода без съдържание на нуклеаза)	Вода без съдържание на нуклеаза	5 × 525 µl
Наръчник за therascreen <i>IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> (Английски)		1

Необходими, но непредоставени материали

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация се обърнете към съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS), предоставени от доставчика на продукта.

Важно: Уверете се, че апаратите, използвани при тази процедура, са проверени и калибрирани съгласно препоръките на производителя.

Реактиви (ръчно извличане на ДНК)

- Набор за извличане на ДНК: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (кат. № 56404)
- RNase A (17,500 U) (кат. № 19101)
- Ксилен или Histolemon™ (Carlo Erba, кат. № 454911, www.carloerbareagents.com)
- Етанол (96 – 100%)
- 1x TE буфер, pH 8,0

Реактиви (автоматично извличане на ДНК)

- Набор за извличане на ДНК: QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (кат. № 937236)
- Buffer ATL (кат. № 19076 или 939016)
- RNase A (кат. № 19101)
- Ксилен или Histolemon (Carlo Erba, кат. № 454911, www.carloerbareagents.com)
- Етанол (96 – 100%)
- 1x TE буфер, pH 8,0

Консумативи

- Скалпели
- Стерилни накрайници за пипети за PCR без нуклеаза и устойчиви на аерозол, с хидрофобни филтри

- 2,0 ml или 1,5 ml епруветки без съдържание на нуклеаза
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, за Rotor-Gene Q (кат. № 981103 или 981106)
- Лед

Допълнителни консумативи за автоматизирано извличане на ДНК

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

Оборудване

- Статив за предметни стъкла и 2 съвместими вани за предметни стъкла за ксилен/Histolemon и етанол
- Микролитърни пипети, предназначени за PCR (1 – 10 µl; 10 – 100 µl; 100 – 1000 µl)
- Настолна центрофуга с ротор за 0,5 ml/1,5 ml реакционни епруветки и микроплаки (която може да достигне 13 000 – 14 000 об./мин)
- Настолен вихров смесител
- Апарат за real-time PCR: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM и свързани с него специфични материали
- Софтуер на Rotor-Gene Q MDx, версия 2.1.0 или по-нова
- Биофотометър
- Термомиксер, нагреваем орбитален инкубатор, нагревателен блок или водна баня с възможност за инкубация при 56 °C и 90 °C

Допълнително оборудване за автоматично пречистване

- Апарат QIASymphony SP
- Софтуер на QIASymphony SP, версия 4.0 или по-нова

Предупреждения и предпазни мерки

За инвитро диагностика

Информация за безопасност

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Те са достъпни онлайн в PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и отпечатате информационния лист за безопасност (Safety Data Sheet, SDS) за всеки набор QIAGEN и неговите компоненти.

За информация за безопасност на използвания набор за пречистване вижте съответния наръчник за набора. За информация за безопасност по отношение на апаратите вижте съответното ръководство за потребителя на апарата.

Общи предпазни мерки

- Тестът е предназначен за използване с буферирани, фиксирани с формалин, вградени в парафин (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) проби от хирургична резекция на тъкан.
- Всички химикали и биологични материали са потенциално опасни. Пробите и аликвотните части са потенциално инфекциозни и трябва да се третират като биологично опасни материали.
- Изхвърлете аликвотната част и отпадъка от анализа в съответствие с местните процедури за безопасност.
- Реактивите за *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit са оптимално разреждени. Не разреждайте допълнително реактивите, тъй като това може да доведе до влошаване на характеристиките им. Не използвайте реакционни обеми (реакционна смес плюс аликвотна част) под 25 µl.

- Всички реактиви, доставени с *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, са предназначени да бъдат използвани единствено с останалите реактиви в същия набор. Не замествайте реактиви между наборите *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kits, тъй като това може да повлияе на ефективността им.
- За допълнителни предупреждения, предпазни мерки и процедури вижте ръководството за потребителя на апарата Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Допълнително разреждане на реактивите или промяна на инкубацията и температурите, могат да доведат до погрешни или фалшиви данни.
- Не използвайте неправилно съхранявани компоненти или такива с изтекъл срок на годност.
- Смеси на праймери и проба могат да претърпят изменения, ако бъдат изложени на светлина.
- Проявете изключително внимание, за да не замърсите смесите със синтетичните материали, съдържащи се в реактива на положителната контрола.
- Проявете изключително внимание, за да избегнете замърсяване с DNase, която може да предизвика разграждане на матричната ДНК.
- Използвайте отделни, специализирани пипети за приготвяне на реакционни смеси и добавяне на еталони.
- Извършвайте приготвянето и разпределянето на реакционните смеси в зона, отделена от използваната за добавяне на еталони.
- Не отваряйте апарата Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM преди завършване на цикъла.
- Не отваряйте епруветките на Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM след завършване на цикъла.
- Проявете внимание за осигуряване на правилно тестване на аликвотните части, за да избегнете неправилно въвеждане, грешки при зареждане и пипетиране.

Съхранение и боравене с реактиви

Условия за транспортиране

Наборът *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit се транспортира в сух лед. Ако при пристигане някой от компонентите на набора *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit не е замразен, ако по време на транспортиране външната опаковка е била отворена или ако пратката не съдържа опаковъчен лист, наръчник за употреба или реактивите, се свържете с някой от отделите за техническо обслужване на QIAGEN или с местните дистрибутори (посетете www.qiagen.com).

Съхранение

Непосредствено след получаване, наборът *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit трябва да се съхранява във фризер с постоянна температура в интервала -30 до -15 °C, защитен от светлина.

Стабилност

При съхраняване в посочените условия, *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit е стабилен до посочената дата на изтичане срока на годност.

След отваряне реактивите могат да се съхраняват в оригиналната им опаковка при температури -30 до -15 °C до изтичане на срока на годност, посочен върху опаковката. Многократното размразяване и замразяване трябва да се избягва. Не превишавайте максималния брой от 5 цикъла на замразяване и размразяване.

Съхранение и работа с проби

Наборът *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit е предназначен за използване с аликвотни части от ДНК, извлечени от фиксирана с формалин, вградена в парафин (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) тъкан, от хирургични резекции, взета от пациенти с рак на мозъка. Всички тъканни аликвотни части трябва да се третират като потенциално опасни.

- Тъканните проби трябва да бъдат фиксирани в 4 – 10% неутрално буфериран формалин (Neutral Buffered Formalin, NBF).
- От парафиновия блок трябва да се изрежат последователни 10 µm среза, които да се монтират върху предметни стъкла.
- Обучено лице (напр. патолог) трябва да оцени туморното съдържание и площта в оцветената с хематоксилин и еозин (Hematoxylin & Eosin, H&E) област. Използвайте последователни срезове за извличане на ДНК.
- За изпитването са годни само срезове с $\geq 40\%$ туморно съдържание.
- За срезове, съдържащи туморна площ $< 50 \text{ mm}^2$, препоръчваме да бъдат обработени достатъчен брой срезове, за увеличаване на общата тъканна площ до най-малко 50 mm^2 (100 mm^2 за автоматизирано извличане върху QIASymphony SP).
- Означавайте, съхранявайте и работете с туморните проби, блоковете, препаратите и аликвотните части, готови за извличане, по контролиран начин в съответствие с възприетите местни процедури.
- Съхранявайте блоковете FFPE и предметните стъкла с препаратите на стайна температура. Предметните стъкла с препаратите могат да бъдат съхранявани до 4 седмици преди наборът *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit да бъде използван за извличане на ДНК.
- След извличане, геномната ДНК може да се съхранява до 1 седмица при температури 2 – 8 °C или 8 седмици при -25 до -15 °C.


Процедура

Извличане на ДНК и подготовка

Използвайте набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (кат. № 56404) или QIASymphony DSP DNA Mini Kit (кат. № 937236) за пречистване на геномна ДНК от алиquotни части, приготвени от проби от мозъчни злокачествени тумори в FFPE.

Забележка: Наборът *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit е валидиран единствено в комбинация с QIAamp DNA FFPE Tissue Kit или QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Не използвайте друг продукт с извлечена ДНК.

Използване на QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

<p>ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Внимателно прочетете следните модификации, които трябва да бъдат приложени към протокола QIAamp.</p>
--	---

- За подготовка на алиquotните части преди депарафиниране и извличане на ДНК вижте “Изходен материал” в наръчника *QIAamp DNA FFPE Tissue* и Съхранение и работа с проби, страница 18 в този наръчник.
- Наборът QIAamp DNA FFPE Tissue Kit трябва да се използва само ръчно.
- Трябва да бъде изпълнена стъпка RNase, описана в наръчника *QIAamp DNA FFPE Tissue*.
- Не използвайте разтвор за депарафиниране QIAGEN Deparaffinization Solution. За депарафиниране, използвайте само метода с ксиленол/етанол, описан в “Процедура за депарафиниране на препарат/предметно стъкло при използване на QIAamp DNA FFPE Tissue Kit”, отдолу. Ксиленът може да бъде заменен с Histolemon (заместител на ксилена).
- Разтварянето на протеиназа К трябва да се извършва в продължение на 1 час.


- Аликвотните части трябва да се елюират двукратно в 30 µl елюирац буфер (Buffer ATE) от набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Процедура за депарафиниране на препарат/предметно стъкло при използване на QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

1. Поставете предметните стъкла в специфичния статив за предметни стъкла.
2. Поставете статива за предметни стъкла във вана, съдържаща ксилен или Histolemon в продължение на 2 минути. Разтърсете с 2 или 3 движения напред-назад.
3. Поставете статива във втора вана, съдържаща етанол (96 – 100%) за 2 минути. Разтърсете с 2 или 3 движения напред-назад.
4. Изсушете предметните стъкла при 15 – 37 °C. Това ще отнеме известно време.
5. Обозначете с етикет 1,5 ml микроцентрифужни епруветки за всяка аликвотна част и добавете към всяка от епруветките 180 µl Buffer ATL (от набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit).
6. Капнете няколко капки Buffer ATL върху тъканните срезове на предметните стъкла (достатъчно, за да покрият повърхността на тъканите).
7. Изстържете повърхността на тъканта със стерилен скалпел и добавете изстърганата тъкан към съответно обозначената микроцентрифужна епруветка.
8. Добавете към всяка епруветка 20 µl протеиназа К (от набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) и смесете като използвате вихров смесител.
9. Инкубирайте при 56 °C в продължение на 1 час.

Продължете с инкубационната стъпка при 90 °C от протокола за QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (стъпка 12 в ръчника *QIAamp DNA FFPE Tissue*, юни 2012, страница 13).

Използване на QIASymphony DSP DNA Mini Kit

ВНИМАНИЕ 	Внимателно прочетете следните модификации, които трябва да бъдат приложени към листа от протокола QIASymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.
--	---

- За подготовка на аликвотните части преди депарафиниране и извличане на ДНК виж “Съхранение и работа с проби”, страница 18.
- Трябва да бъде изпълнена стъпка RNase, описана в страницата на протокола QIASymphony SP.
- Не използвайте разтвор за депарафиниране QIAGEN Deparaffinization Solution. За депарафиниране, използвайте само метода с ксиленол/етанол, описан в Процедура за депарафиниране на препарат/предметно стъкло при използване на QIASymphony DSP DNA Mini Kit отдолу. Ксиленът може да бъде заменен с Histolemon (заместител на ксилена).
- Разтварянето на протеиназа К трябва да се извършва в продължение на 1 час.
- Върху сензорния екран трябва да изберете обем на елуиране 50 µl.

Процедура за депарафиниране на препарат/предметно стъкло при използване на QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Извършете депарафинирането съгласно следните стъпки, различаващи се от протокола в страницата QIASymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Поставете предметните стъкла в специфичния статив за предметни стъкла.
2. Поставете статива за предметни стъкла във вана, съдържаща ксилен или Histolemon в продължение на 2 минути. Разтърсете с 2 или 3 движения напред-назад.
3. Поставете статива във втора вана, съдържаща етанол (96 – 100%) за 2 минути. Разтърсете с 2 или 3 движения напред-назад.

4. Изсушете предметните стъкла при 15 – 37 °C. Това ще отнеме известно време.
5. Обозначете с етикет 1,5 ml микроцентрифужни епруветки за всяка аликвотна част и добавете към всяка от епруветките 220 µl Buffer ATL.
6. Капнете няколко капки Buffer ATL върху тъканните срезове на предметните стъкла (достатъчно, за да покрият повърхността на тъканите).
7. Изстържете повърхността на тъканта със стерилен скалпел и добавете изстърганата тъкан към съответно обозначената микроцентрифужна епруветка.
8. Добавете към всяка епруветка 20 µl протеиназа К (от набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) и смесете като използвате вихров смесител.

Продължете със стъпката за инкубиране при 56 °C в страницата от протокола в страницата QIASymphony SP: Протокол Tissue_LC_200_V7_DSP (стъпка 12 в протокола “Депарафиниране с ксилен”, април 2012 г.). Инкубирайте при 56 °C в продължение на 1 час.

Геномна ДНК

Съхранявайте геномната ДНК до 1 седмица при температури 2 – 8 °C или 8 седмици при -25 до -15 °C.

Количеството ДНК трябва да се определи чрез измерване на оптичестката плътност (Optical Density, OD) на аликвотната част при 260 nm.

Разредете ДНК до концентрация от 5 ng/µl в 1x TE буфер при pH 8,0.

Реакцията PCR е оптимизирана за аликвотни части, съдържащи 25 ng пречистена геномна ДНК.

Протокол: Откриване на мутации в *IDH1/2*

Важни моменти преди да започнете

- За оптимално използване на набора *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* аликвотните части трябва да се групират в партиди по 4. По-малкият размер на партидата означава, че ще могат да се тестват по-малко на брой аликвотни части с всеки *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*.
- Препоръчваме тестване на всички аликвотни части едновременно в рамките на един цикъл PCR, както е посочено в Таблица 2 и съгласно схемата в зареждащия блок и ротора, както е посочено в Таблица 3 и Фигура 2.

Таблица 2. Брой реакции за апарати апарат Rotor-Gene Q MDx с ротор за 72 епруветки

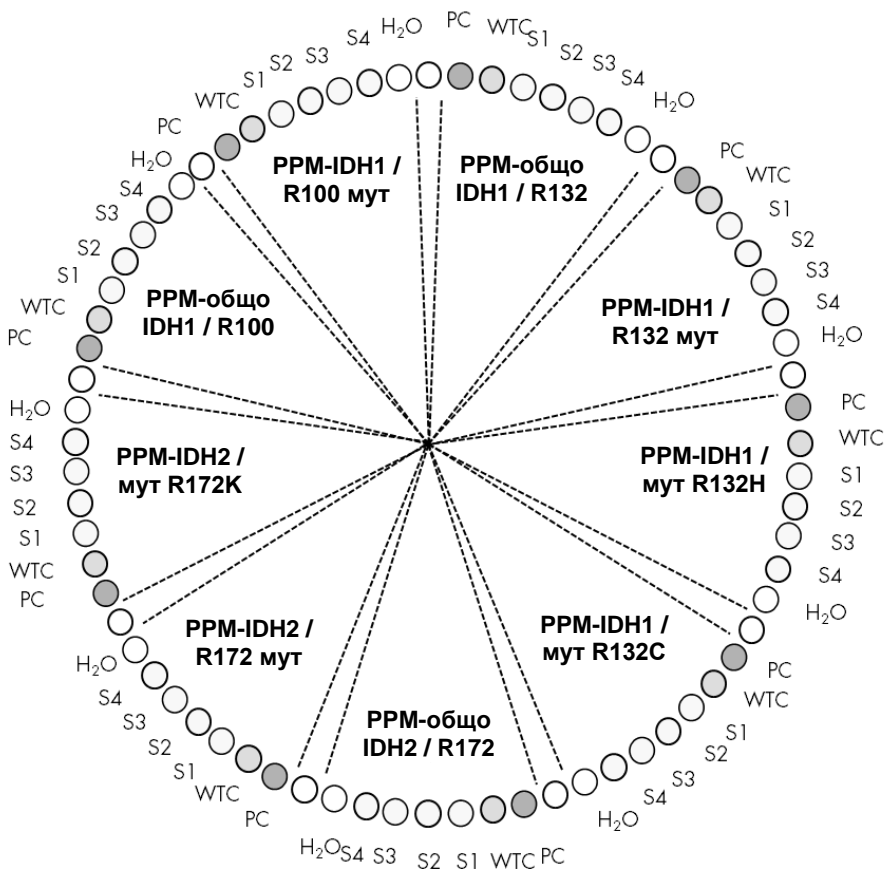
Аликвотни части	Реакции
n аликвотни части от ДНК	n × 1 реакция
2 ДНК контроли	2 реакции: Положителни и WT контроли, всяка тествана веднъж за един цикъл PCR
Водна контрола	1 реакция

Таблица 3. Препоръчителен блок за зареждане за експеримент с *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Аликвотна част	Общо IDH1/ R132	IDH1/ R132 мут	IDH1 мут R132H	IDH1 мут R132C	Общо IDH2/ R172	IDH2/ R172 мут	IDH2 мут R172K	Общо IDH1/ R100	IDH1/ R100 мут
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
Празна епруветка	8	16	24	32	40	48	56	64	72

* PC: Положителна контрола.

† WTC: Контрола Див тип (Wild-Type, WT).



Фигура 2. Препоръчителна конфигурация на ротор за зареждане за експеримент с *therascreen IDH1/2* RGQ PCR Kit.

Важно: Внимавайте винаги да поставяте аликвотната част, която ще бъде тествана в позиция 1 на ротора. В противен случай апаратът няма да изпълни калибриране и ще бъдат отчетени неверни данни за флуоресценция.

Процедура

1. Размразете всички необходими компоненти и ги поставете върху лед.
2. Пригответе следните PCR смеси в съответствие с броя аликвотни части, които се обработват.

Забележка: Всички концентрации са за крайния обем на реакцията.

Таблица 4 описват схемата на пипетиране за получаването на една смесь от реактиви, изчислена за постигане на краен реакционен обем от 25 µl. В съответствие с броя на реакциите, предварителна смесь може да бъде подготвена за всеки PPM. За компенсирание на грешка в пипетирането са включени допълнителни обеми.

Таблица 4. Подготовка на смеси за PCR

Компонент	1 реакция (µl)	Предварителна смесь: 7 + 1 реакции (µl)	Крайна концентрация
qPCR основна смесь, 2x	12,5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Вода без съдържание на нуклеаза	6,5	52	–
Аликвотна часть или контрола† (да бъде добавена в стъпка 4)	5	5 от всяка	–
Общ обем	25	25 от всяка	–

* Подгответе 9 предварителни смеси, по една от всеки PPMs предоставени с набора.

† Положителна контрола, отрицателна контрола и водна контрола.

3. Дозирайте 20 µl от разтвора на предварителната смесь във всяка епруветка на Rotor-Gene (Таблица 3).
4. Добавете 5 µl от материала, който трябва да бъде количествено определен (25 ng аликвотна часть от геномна ДНК или контрола) в съответната епруветка (общ обем 25 µl; Таблица 3).
5. Смесете внимателно като пипетирате и отпипетирате.

6. Поставете епруветките в адаптера, предоставен с апарата (Фигура 2).
Забележка: Неизползваните позиции трябва да бъдат попълнени с празни епруветки.
7. Заредете пълния адаптер в апарата Rotor-Gene Q MDx.
8. Програмирайте апарата Rotor-Gene Q MDx с програмата за термосайклер, както е посочено в Таблица 5.

Таблица 5. Температурен профил

Hold (Задържане)	Temperature (Температура): 95 °C Time (Време): 10 min
Cycling (Циклизиране)	40 пъти 95 °C за 15 секунди 60 °C за 60 сек. с получаване на FAM™ флуоресценция в канал Green: Single (Една)

9. Щракнете върху **Gain Optimisation** (Оптимизиране на усилването) в диалоговия прозорец „New Run Wizard (Съветник за ново изпълнение)“, за да отворите диалоговия прозорец „Auto-Gain Optimisation Setup (Настройка на оптимизирането на автоматичното усилване)“. Настройте диапазона за канал Green от **2FI** за **Min Reading** (Мин. отчитане) на **10FI** за **Max Reading** (Макс. отчитане).
10. Поставете отметка на **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Извършване на оптимизация преди 1-во получаване), и затворете диалоговия прозорец Auto-Gain Optimisation Setup (Настройка на оптимизирането на автоматичното усилване).
11. Стартирайте програмата за термично циклизиране.

12. След като програмата за термично циклизиране завърши, изпълнете следното:
- 12a. Изберете **Options** (Опции) > **Crop Start Cycles** (Съкращаване на стартирането на цикли). Премахнете данните преди цикъл **10**, така че да елиминирате всички артефакти.
 - 12b. Изберете **Analysis** (Анализ) > **Cycling A. Green from 10** (Cycling A. Green от 10), обозначен в отчета като “left threshold = 10.00” (лява прагова стойност = 10,00).
 - 12c. Изберете като метод за нормализация **Dynamic Tube** (Динамична епруветка) и **Slope Correct** (Корекция на наклона), за да коригирате наклона на шума.
 - 12d. Задайте **Outlier Removal** (Отстраняване на рязко отличаващите се стойности) на **0%** (съответства на праговата стойност NTC).
 - 12e. Задайте като изключена **Reaction Efficiency Threshold** (Прагова стойност за ефективност на реакция).
 - 12f. Определете праговата стойност на **0,03**.
 - 12g. Задайте графиката в линеен мащаб.
 - 12h. Изберете **Digital Filter** (Цифров филтър): **Light** (Светлина).

Интерпретиране на резултатите

Водни контроли

Водните контроли (контроли без еталон) трябва да дават нулеви стойности C_T за всички смеси на праймери и проба.

Ако с водна контрола бъде получена положителна стойност C_T , това е резултат от кръстосано замърсяване. Вижте „Ръководство за отстраняване на проблеми“, страница 38, за да намерите решение.

Контрол на качеството с използване на стойности C_T на контроли

IDH1/2 контролата от див тип (Wild-Type Control, WTC) и положителната контрола (мут-PC) на мутирал *IDH1/2* позволяват валидиране на експеримента.

- Ако няма C_T стойност, контролата се класифицира като мутационно-отрицателна за съответния анализ за откриване.
- При установяване на C_T стойност, изчислете ΔC_T както следва за всяка контрола

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R132 мут} = C_T \text{ IDH1/R132 мут} - C_T \text{ Общо IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2/R172 мут} = C_T \text{ IDH2/R172 мут} - C_T \text{ Общо IDH2/R172}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R100 мут} = C_T \text{ IDH1/R100 мут} - C_T \text{ Общо IDH1/R100}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 мут R132H} = C_T \text{ IDH1 мут R132H} - C_T \text{ Общо IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 мут R132C} = C_T \text{ IDH1 мут R132C} - C_T \text{ Общо IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 мут R172K} = C_T \text{ IDH2 мут R172K} - C_T \text{ Общо IDH2/R172}$$

Контролите се класифицират като мутационно-положителни, ако стойностите ΔC_t са по-ниски или равни на съответните гранични стойности ΔC_t , посочени в Таблица 6. Ако стойността ΔC_t е по-висока от граничната, контролата се класифицира като мутационно-отрицателна за конкретния анализ на мутация.

Таблица 6. Гранични стойности за всеки анализ на мутация

Анализ на мутация	Гранична стойност (ΔC_t)
IDH1/R132 мут	5,34
IDH2/R172 мут	6,42
IDH1/R100 мут	4,65
IDH1 мут R132H	6,87
IDH1 мут R132C	7,14
IDH2 мут R172K	8,49

- За всеки анализ на мутация *IDH1/2* контролата от див тип трябва да се открива като мутационно-отрицателна (Таблица 7).
- За всеки анализ на мутация *IDH1/2* положителната контрола трябва да се открива като мутационно-положителна (Таблица 7).

Ако едното или и двете условия не са спазени, целият експеримент се отхвърля.

Таблица 7. Пример за валидиране на цикъл с контроли

Стойност	Вода (NTC)	IDH1/IDH2 WT контрола	IDH1/ IDH2 положителна контрола
СТ общо IDH1/R132	Не се открива	25,45	23,95
СТ IDH1/R132 мут	Не се открива	34,32	25,76
Δ СТ IDH1/R132 мут	Не се открива	8,87	1,81
СТ общо IDH2/R172	Не се открива	25,42	24,93
СТ IDH2/R172 мут	Не се открива	34,36	26,36
Δ СТ IDH2/R172 мут	Не се открива	8,94	1,43
СТ общо IDH1/R100	Не се открива	26,30	24,69
СТ IDH1/R100 мут	Не се открива	33,04	26,39
Δ СТ IDH1/R100 мут	Не се открива	6,74	1,70
СТ IDH1 мут R132H	Не се открива	35,20	26,48
Δ СТ IDH1 мут R132H	Не се открива	9,75	2,53
СТ IDH1 мут R132C	Не се открива	37,16	27,07
Δ СТ IDH1 мут R132C	Не се открива	11,71	3,12
СТ IDH2 мут R172K	Не се открива	Не е открита	27,97
Δ СТ IDH2 мут R172K	Не се открива	Неприложимо	3,04

Валидиране на въведения обем аликвотна част

Преди интерпретиране е необходимо въведения обем аликвотна част да бъде валидиран.

Стойността C_T получена за аликвотна част с всяка PPM-общо ($C_{T \text{ Общо IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Общо IDH2/R172}}$ и $C_{T \text{ Общо IDH1/R100}}$), трябва да бъде по-ниска от 32,00. Стойности $C_{T \text{ Общо}} \geq 32,00$ се дължат на лошото качество на ДНК. Аликвотната част трябва да бъде тествана отново. Ако количеството ДНК е недостатъчно, извечете повече туморна тъкан, ако имате на разположение (вижте “Ръководство за отстраняване на проблеми”, страница 38).

Резултати за аликвотна част

Откриване на мутация *IDH1/2*

За всяка аликвотна част, изчислете стойностите ΔC_T , получени от всеки анализ за откриване на мутация (PPM-IDH1/R132 мут, PPM-IDH2/R172 мут, PPM-IDH1/R100 мут), както следва:

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R132 мут}} = C_{T \text{ IDH1/R132 мут}} - C_{T \text{ Общо IDH1/R132}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH2/R172 мут}} = C_{T \text{ IDH2/R172 мут}} - C_{T \text{ Общо IDH2/R172}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R100 мут}} = C_{T \text{ IDH1/R100 мут}} - C_{T \text{ Общо IDH1/R100}}$$

Ако за анализ за откриване на мутация няма стойност C_t , аликвотната част трябва да бъде класифицирана като мутационно-отрицателна за конкретната мутация.

Аликвотните части се класифицират като мутационно-положителни, ако стойността ΔC_T е по-ниска или равна на съответната гранична стойност ΔC_T на съответния анализ за откриване на мутация, посочена в Таблица 8.

Таблица 8. Гранични стойности за всеки анализ за откриване на мутация

Анализ на мутация	Гранична стойност (ΔC_T)
IDH1/R132 мут	5,34
IDH2/R172 мут	6,42
IDH1/R100 мут	4,65

Идентификация на мутация *IDH1/2*

За всяка алиquotна част, изчислете стойностите ΔC_T , получени от всеки анализ за идентификация на мутация (PPM-IDH1 мут R132H, PPM-IDH1 мут R132C, PPM-IDH2 мут R172K), както следва:

$$\Delta C_T \text{ IDH1 мут R132H} = C_T \text{ IDH1 мут R132H} - C_T \text{ Общо IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 мут R132C} = C_T \text{ IDH1 мут R132C} - C_T \text{ Общо IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 мут R172K} = C_T \text{ IDH2 мут R172K} - C_T \text{ Общо IDH2/R172}$$

Ако за анализ за идентификация на мутация няма стойност C_T , алиquotната част трябва да бъде класифицирана като мутационно-отрицателна.

Мутация на алиquotната част се идентифицира, ако стойността ΔC_T е по-ниска или равна на съответната гранична стойност ΔC_T на съответния анализ за идентификация на мутация, посочена в Таблица 9. Примери за интерпретация на ΔC_T са показани в Таблица 10 и Таблица 11.

Таблица 9. Гранични стойности за всеки анализ за идентификация на мутация

Анализ на мутация	Гранична стойност (ΔC_T)
IDH1 мут R132H	6,87
IDH1 мут R132C	7,14
IDH2 мут R172K	8,49

Таблица 10. Пример за откриване на мутация *IDH1/2*

Стойност	Аликвотна част 1	Аликвотна част 2
С _T Общо IDH1/R132	26,39	26,32
С _T IDH1/R132 мут	33,86	28,29
Δ С _T IDH1/R132 мут	7,47	1,97
С _T Общо IDH2/R172	26,79	25,79
С _T IDH2/R172 мут	35,13	35,21
Δ С _T IDH2/R172 мут	8,34	9,42
С _T Общо IDH1/R100	27,20	27,37
С _T IDH1/R100 мут	33,83	33,76
Δ С _T IDH1/R100 мут	6,63	6,39
Откриване на мутация	Не е открита мутация	Открита е мутация R132

Таблица 11. Пример за идентификация на мутация *IDH1/2*

Стойност	Аликвотна част 1	Аликвотна част 2
С _T Общо <i>IDH1/R132</i>	26,39	26,32
С _T <i>IDH1</i> мут <i>R132H</i>	33,82	28,27
Δ С _T <i>IDH1</i> мут <i>R132H</i>	7,43	1,95
С _T Общо <i>IDH1/R132</i>	26,39	26,32
С _T <i>IDH1</i> мут <i>R132C</i>	37,94	Не е открита
Δ С _T <i>IDH1</i> мут <i>R132C</i>	11,55	Неприложимо
С _T Общо <i>IDH2/R172</i>	26,79	25,79
С _T <i>IDH2</i> мут <i>R172K</i>	Не е открита	Не е открита
Δ С _T <i>IDH2</i> мут <i>R172K</i>	Неприложимо	Неприложимо
Идентификация на мутация	Не е открита мутация	Открита е мутация за <i>R132H</i>

Интерпретация на мутации в *IDH1/2*

Процедурата за свързване на тип мутация *IDH1/2* към алиquotни части, положителни за мутация *IDH1/2*, е показана в Таблица 12. Пример за интерпретация е показан в Таблица 13.

Таблица 12. Ръководство за интерпретация

		Идентификация на мутация			
		открита <i>IDH1</i> мут R132H	открита <i>IDH1</i> мут R132C	открита <i>IDH2</i> мут R172K	Не е открита мутация
Откриване на мутация	Открита е мутация R132	Открита е мутация R132H	Открита е мутация R132C	–	Мутация R132, но нито R132H, нито R132C
	Открита е мутация R172	–	–	Открита е мутация R172K	Мутация R172, но не R172K
	Открита е мутация R100	–	–	–	R100
	Не е открита мутация	Открито ниско съдържание на мутация R132H (между 1% и 2%)*	Открито ниско съдържание на мутация R132C (между 1% и 4%)*	Открито ниско съдържание на мутация R172K (приблизително 1%)*	Не е открита мутация

* Тези случаи могат да възникнат рядко и се налага да се проверят всички алиquotни части и технически критерии за приемане, особено съдържанието на туморни клетки. Ако са изпълнени всички критерии, алиquotната част трябва да бъде тествана повторно.

Таблица 13. Пример за докладване и интерпретация на *IDH1/2* мутация

	Аликвотна част 1	Аликвотна част 2
Откриване на мутация	Не е открита мутация	Открита е мутация R132
Идентификация на мутация	Не е открита мутация	Открита е мутация за R132H
Интерпретиране на резултатите	Не е открита нито идентифицирана мутация	Мутирала R132H

Забележка: Ако аликвотна част има 2 или повече стойности ΔC_T които са равни или по-ниски от граничните стойности ΔC_T , състоянието на мутация се отнася към най-голямата разлика между граничната и получената стойност ΔC_T . Виж примерите в Таблица 14.

Таблица 14. Пример за интерпретация в случай на множество положителни резултати

	Аликвотна част 3	Аликвотна част 4
ΔC_T <i>IDH1/R132</i> мут	1,24	5,24
ΔC_T cutoff <i>IDH1/R132</i> мут	5,34	5,34
$(\Delta C_T$ cutoff – $\Delta C_T)$ <i>IDH1/R132</i> мут	4,10	0,10
ΔC_T <i>IDH2/R172</i> мут	5,32	5,95
ΔC_T cutoff <i>IDH2/R172</i> мут	6,42	6,42
$(\Delta C_T$ cutoff – $\Delta C_T)$ <i>IDH2/R172</i> мут	1,10	0,47
Интерпретиране на резултатите	Мутирала R132	Мутирала R172

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. За повече информация посетете www.qiagen.com.

Коментари и предложения

Задръстена колона по време на извличане на ДНК

Непълно лизиране

Повторете конфигурацията.

Оставащият лизат може да бъде прехвърлен в нова колона.

Повторете цикъла на екстрахиране с по-малко тъкан FFPE.

Недостатъчно ДНК в екстрахирания елуат

Недостатъчна площ на тъкан FFPE

Повторете цикъла на екстрахиране с повече FFPE тъкани срезове.

Не е открита контрола IDH1/2 WT

а) Грешки при пипетиране или пропуснати реактиви; обръщане на епруветка или ямка

Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.

Повторете изпълнението на PCR.

б) Неправилно съхранение на компонентите на набора

Съхранявайте *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit при -30 до -15 °C и пазете от светлина смесите от праймери и проба. Вижте "Съхранение и боравене с реактиви", страница 17.

Не превишавайте максималния брой от 5 цикъла на замразяване и размразяване.

в) Срокът на годност на *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit е изтекъл

Проверете условията на съхранение и датата на изтичане на срока на годност (вижте етикета на набора) на реактивите и ако е необходимо, използвайте нов *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Коментари и предложения

Не е открита положителна контрола *IDH1/2*

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Грешки при пипетиране или пропуснати реактиви; обръщане на епруветка или ямка | Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.
Повторете изпълнението на PCR. |
| b) | Неправилно съхранение на компонентите на набора | Съхранявайте <i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> при -30 до -15 °C и пазете от светлина смесите от праймери и проба. Вижте “Съхранение и боравене с реактиви”, страница 17.

Не превишавайте максималния брой от 5 цикъла на замразяване и размразяване. |
| c) | Срокът на годност на <i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> е изтекъл | Проверете условията на съхранение и датата на изтичане на срока на годност (вижте етикета на набора) на реактивите и ако е необходимо, използвайте нов <i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> . |

Няма сигнал, включително няма сигнал за контроли

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Няма реакционна епруветка в позиция 1 на апарата Rotor-Gene Q MDx | Внимавайте винаги да поставяте аликвотната част, която ще бъде тествана в позиция 1 на ротора. В противен случай апаратът няма да изпълни калибриране и ще бъдат отчетени неверни данни за флуоресценция. |
| b) | Грешки при пипетиране или пропуснати реактиви; обръщане на епруветка или ямка | Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.
Повторете изпълнението на PCR. |

Коментари и предложения

- | | | |
|----|--|--|
| c) | Неправилно съхранение на компонентите на набора | Съхранявайте <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit при -30 до -15 °C и пазете от светлина смесите от праймери и проба. Вижте “Съхранение и боравене с реактиви”, страница 17.

Не превишавайте максималния брой от 5 цикъла на замразяване и размразяване. |
| d) | Срокът на годност на <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit е изтекъл | Проверете условията на съхранение и датата на изтичане на срока на годност (вижте етикета на набора) на реактивите и ако е необходимо, използвайте нов <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |
| e) | Избран неправилен канал за откриване | Настройте канала за откриване на Cycling Green или 530 nm/640 nm. |
| f) | Няма програма за получаване на данни | Проверете програмата за циклизиране. Виж Таблица 5, страница 27.

Изберете режим на получаване Single (Единичен) в края на всеки сегмент за топлинна обработка на програмата за PCR. |

Интензивността на флуоресценцията варира

- | | |
|---|---|
| Грешки при пипетиране или пропуснати реактиви; обръщане на епруветка или ямка | Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.

Повторете изпълнението на PCR. |
|---|---|

Твърде ниска интензивност на флуоресценцията

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Неправилно съхранение на компонентите на набора | Съхранявайте <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit при -30 до -15 °C и пазете от светлина смесите от праймери и проба. Вижте “Съхранение и боравене с реактиви”, страница 17.

Не превишавайте максималния брой от 5 цикъла на замразяване и размразяване. |
|----|---|--|

Коментари и предложения

- | | |
|---|---|
| b) Срокът на годност на <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit е изтекъл | Проверете условията на съхранение и датата на изтичане на срока на годност (вижте етикета на набора) на реактивите и ако е необходимо, използвайте нов <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |
| c) Много ниско количество на прицелна ДНК | Винаги проверявайте концентрацията на ДНК преди стартиране. Вижте “Извличане на ДНК и подготовка”, страница 19. |

Отрицателна контрола (H₂O) показва положителен резултат

Кръстосано замърсяване, замърсяване с реактив, грешка в апарата, обръщане на ямка или капиляр, или разграждане на проба

Заменете всички реактиви от критично значение или използвайте нов набор *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

За да предотвратите замърсяване чрез пренасяне, винаги работете с аликвотните части, компонентите на набора и консумативите в съответствие с възприетите стандартни практики.

Пазете от слънчева светлина смесите от праймери и проба.

Проверете за фалшиви положителни при флуоресцентните криви.

Проверете настройката на реакцията. Вижте

“Протокол: Откриване на мутации в IDH1/2”, страница 23.

Контрол на качеството

В съответствие с ISO-сертифицираната система за управление на качеството на QIAGEN всяка партида на набора *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit е тестван за предварително определени спецификации, за да се гарантира постоянно качество на продукта. Сертификатите за анализ могат да бъдат получени при поискване на www.qiagen.com/support/.

Ограничения

Този набор е предназначен за професионална употреба.

Продуктът може да се използва само от персонал, специално инструктиран и обучен в техниките на молекулярната биология и запознат с тази технология.

Този набор трябва да се използва съгласно дадените в настоящото ръководство инструкции, в комбинация с утвърден апарат, посочен в „Необходими, но непредоставени материали“, стр. 13.

Трябва да се проверяват датите на изтичане на сроковете на годност, отпечатани на опаковката и етикетите на всички компоненти. Не използвайте компоненти с изтекъл срок на годност.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit е валидиран само за буферирана, фиксирана с формалин, вградена в парафин мозъчна тъкан.

Наборът *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit е валидиран единствено за използване с QIAamp DNA FFPE Tissue Kit или QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Валидирани са само Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (за PCR) и QIASymphony SP (за подготовка на алиquotна част).

Всяка употреба на този продукт и/или модификация на компоненти, които не отговарят на изискванията, ще анулира отговорността на QIAGEN

Потребителят носи отговорност за валидиране на характеристиките на системата при процедури, използвани в лабораторията, които не се обхващат от изпитванията на QIAGEN.

Тестът е предназначен да открива 7 мутации в кодони 132 и 100 на ген *IDH1* и 5 мутации в кодон 172 на ген *IDH2*. Аликвотни части с резултати, отчетени като “няма открита мутация” може да съдържат мутации в *IDH1* или *IDH2*, които не са открити от анализа.

Откриването на мутации зависи от целостта на аликвотната част, туморното съдържание и количеството налична ДНК в пробата, която може да бъде амплифицирана.

Всички диагностични резултати, генерирани с продукта, трябва да бъдат интерпретирани в рамките на контекста на всички съответни клинични или лабораторни находки.

Работни характеристики

Граница на празна проба (LOB)

Границата на празна проба (Limit of Blank, LOB) е определена (в съответствие с насоките CLSI/NCCLS EP17-A; 14) за отрицателни аликвотни части (FFPE нормален мозък, 8 аликвотни части, 64 измервания/партида, 2 партиди).

Резултатите за LOB са представени в Таблица 15.

Таблица 15. Граница на празна проба (Limit of Blank, LOB)

Анализ	LOB	Окончателна LOB
R132 мут	Валидиране на партида 1: 6,57 Валидиране на партида 2: 6,32	6,32
R132H мут	Валидиране на партида 1: 7,91 Валидиране на партида 2: 8,22	7,91
R132C мут	Валидиране на партида 1: 8,04 Валидиране на партида 2: 8,20	8,04
R172 мут	Валидиране на партида 1: 7,74 Валидиране на партида 2: 7,59	7,59
R172K мут	Валидиране на партида 1: 9,93 Валидиране на партида 2: 10,58	9,93
R100 мут	Валидиране на партида 1: 6,52 Валидиране на партида 2: 5,19	5,17

Граница на откриване (LOD)

Границата на откриване (Limit of Detection, LOD или аналитична чувствителност) е определена въз основата на “подход за прецизен профил”, описан в насоки CLSI/NCCLS EP17-A (14). За всяка мутация са използвани пет слабо положителни аликвотни части (плазмидна ДНК инжектирана в глиома див тип ДНК) (30 до 110 измервания за тип мутация и процент мутация).

Резултатите за LOD са представени в Таблица 16.

Таблица 16. Граница на откриване (Limit of Detection, LOD)

Анализ	Мутации	LOD	Гранична стойност за анализа	Чувствителност (%)
R132H мут	R132H	6,87	6,87	0,78
R132C мут	R132C	7,14	7,14	1,19
R172K мут	R172K	8,49	8,49	0,61
R132 мут	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 мут	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 мут	R100Q	4,65	4,65	3,45

Мутация се открива, ако ΔC_T е по-малка или равна на LOD.

Въздействие на входящата ДНК

ДНК е извлечена от 4 различни алиquotни части на глиомен тумор: 2 с див тип *IDH1/2* и 2 носещи мутация *IDH1 R132H (395G>A)*.

За оценка на въздействието на входящата ДНК върху качествените резултати са тествани три различни количества ДНК (включително препоръчаното по протокола). Резултатите показват, че входящата ДНК не оказва въздействие върху качествените резултати. Независимо от това, за входяща ДНК в количества по-малки от препоръчаните (< 25 ng ДНК), са наблюдавани повече технически проблеми (Ст общо QC повреди). Ето защо, за изпълнение на теста, се препоръчва количество входяща ДНК от 25 ng в обем от 5 µl.

Повторяемост и възпроизводимост

Проучването за прецизност бе проведено върху 4 различни алиquotни части (плазмидна ДНК, инжектирана в глиома с див тип ДНК, представителна за див тип (Wild-Type, WT), мутантна и гранична алиquotна част), двукратно тествани 40 пъти (n = 80 измервания).

Стандартните отклонения (Standard Deviations, SD) и коефициентите за отклонение (Coefficients of Variation, CV) са представени в Таблица 17.

Таблица 17. Резултати за прецизност

Анализ	Аликвотна част	Средно ΔCt	SD_R^*	$SD_{\text{цикъл}}^\dagger$	$SD_{\text{общо}}^\ddagger$	$CV_{\text{общо}} (\%)^\ddagger$	Ниво на правилни сигнали
R132C мут	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 мут	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 мут	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: Повторяемост.

† Цикъл: Възпроизводимост между цикли.

‡ Общо: Обща прецизност (включително между апарати, оператори и партии).

Таблицата продължава на следващата страница

Таблица 17. Резултати за прецизност (продължение)

Анализ	Аликвотна част	Средно ΔC_T	SD_R^*	$SD_{\text{Цикъл}}^\dagger$	$SD_{\text{Общо}}^\ddagger$	$CV_{\text{Общо}} (\%)^\ddagger$	Ниво на правилни сигнали
R100 мут	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 мут	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 мут	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: Повторяемост.

† Цикъл: Възпроизводимост между цикли.

‡ Общо: Обща прецизност (включително между апарати, оператори и партии).

Сравняване на методи

Сравнение с имунохистохимия (Immunohistochemistry, IHC) за откриване на *IDH1/R132H*.

Проучването е извършено за да се демонстрира съгласуването между състоянието на мутация, определено с *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* и IHC (античовешки *IDH1R132H* антитела клонинг H09, DIANOVA).

Избрани са общо 103 клинични глиомни аликвотни части. Най-старият блок бе 10 годишен.

Всички аликвотни части преминаха контролите за качество за *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* и IHC.

Резултатите показват процент на съвпадение на положителни резултати (Positive Percentage Agreement, PPA) от 100%, процент на съвпадение на отрицателни резултати (Negative Percent Agreement, NPA) от 98%, и общо съвпадение (Overall Agreement, OA) от 99% (Таблица 18).

Таблица 18. Анализ на съвпаденията между *therascreen* RGQ PCR Kit и ИНС

Степен на съвпадение	Честота (%)	95% доверителен интервал
PPA	45/45 (100%)	[92;100]
NPA	57/58 (98%)	[91;100]
OA	102/103 (99%)	[96;100]

Сравнение с двупосочно секвениране

Проучването е извършено за да се демонстрира съгласуването между състоянието на мутация, определено с *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit и двупосочно секвениране.

Избрани са общо 103 клинични туморни аликвотни части от пациенти с глиома. Най-старият блок бе 10 годишен.

Всички 103 аликвотни части преминаха контролите за качество за *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, а 101 аликвотни части резултати за двупосочно секвениране.

Резултатите показват процент на съвпадение на положителни резултати (Positive Percentage Agreement, PPA) от 100%, процент на съвпадение на отрицателни резултати (Negative Percent Agreement, NPA) от 92%, и общо съвпадение (Overall Agreement, OA) от 96% (Таблицы 19 и 20).

Таблица 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit в сравнение с двупосочно секвениране

		Двупосочно секвениране Sanger				
		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 означава, че е установено, че алиquotна част, мутирала с мутация R132, но не R132H, нито R132C.

† R172 означава, че е установено, че алиquotна част, мутирала с мутация R172, но не с R172K.

Таблица 20. Анализ на съвпаденията с двупосочно секвениране

Степен на съвпадение	Честота (%)	95% доверителен интервал
PPA	50/50 (100%)	[93;100]
NPA	47/51 (92%)	[81;97]
OA	97/101 (96%)	[90;98]

Препратки

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).

СИМВОЛИ

В таблицата по-долу са описани символите, използвани върху етикетите или в настоящия документ.



<N>

Съдържа реактиви, достатъчни за <N> реакции



Използвайте до



Медицинско изделие за инвитро диагностика



Каталожен номер



Партиден номер



Номер на материала (т. е., етикет на компонента)



Компоненти (т. е. списък на това, което е включено)



Съдържание (съдържанието)



Брой (т.е. флакони, бутилки)

Rn

„R“ означава редакция на ръководството,
а „n“ – номерът на редакцията



Глобален номер на търговска единица



Ограничение на температурата



Производител



Направете справка с инструкциите за употреба



Внимание

Информация за поръчка

Продукт	Съдържание	Каталожен №
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	За 20 реакции: 9 смеси праймер и проба, WT контрола, положителна контрола, основна смес, вода без съдържание на нуклеаза	873011
Rotor-Gene Q MDx и принадлежности		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Апарат за цикли real-time PCR и анализатор на стопилки с висока разделителна способност с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс канал HRM, лаптоп, софтуер, принадлежности, 1-годишна гаранция на части и труд, инсталиране и обучение	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Апарат за цикли на real-time PCR с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, не включва инсталиране и обучение	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Алуминиев блок за ръчна подготовка на реакция с едноканална пипета в 72 епруветки x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 ленти от 4 епруветки и капачки за 1000 реакции	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 ленти от 4 епруветки и капачки за 10 000 реакции	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — за пречистване на геномна ДНК от тъкани, вградени в парафин		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	За 50 подготовки за ДНК: 50 QIAamp MinElute® Columns, протеиназа К, буфери и Collection Tubes (2 ml)	56404

Продукт	Съдържание	Каталожен №
QIASymphony DSP DNA Mini Kit — за автоматизирано пречистване на ДНК от 1 – 96 аликвотни части		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	За 192 подготовки, всяка от 200 µl: включват 2 касети с реактив, стативи за ензими, и принадлежности	937236
QIASymphony SP и принадлежности		
QIASymphony SP System	Модул за подготовка на аликвотни части на QIASymphony: включва монтаж и обучение, 1 годишна гаранция за части и труд	9001751
QIASymphony SP	Модул за подготовка на аликвотни части на QIASymphony: включва 1-годишна гаранция за части и труд	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Касети за подготовка на аликвотни части с 8 ямки за употреба с QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers за употреба с QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Филтърни връхчета за еднократна употреба, на статив; (8 x 128). За употреба с апарати QIAScube и QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Филтърни връхчета за еднократна употреба, на статив; (8 x 128). За употреба с апаратите QIASymphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Нестерилни полипропиленови епруветки (0,85 ml максимална вместимост, по-малко от 0,7 ml вместимост за съхранение, 0,4 ml капацитет за елуиране); 2304 в стативи по 96; включва ленти за затваряне	19588

Продукт	Съдържание	Каталожен №
Реактиви		
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 единици/ml, разтвор)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml буфер за лизиране на тъкани за 1000 подготовки	19076

За актуална информация относно лицензирането и заявления за освобождаване от отговорност за конкретни продукти вижте съответния наръчник или ръководство за потребителя на набора QIAGEN. Ръководствата и наръчниците за потребителя на набора QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от „Техническо обслужване“ на QIAGEN или местния дистрибутор.

Хронология на редакциите на документа

Дата	Промени
R5, юли 2020 г.	<p>Редактиран е разделът “Интерпретация на резултатите”, за да се добави информация относно класификацията на контроли и алиquotни части в зависимост от откриване на стойността Ct</p> <p>Редактирана колона за контрола IDH1/IDH2 WT в Таблица 7 за Ct IDH мут R172K и ΔC_T IDH2 мут R172K</p> <p>Редактирани колони за алиquotна част 1 и 2 в Таблица 11 за Ct IDH1 мут R132C, ΔC_T IDH1 мут R132C, Ct IDH2 мут R172K, and ΔC_T IDH2 мут R172K</p>

Тази страница умишлено е оставена празна

Ограничено лицензно споразумение за *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Използването на продукта означава, че закупилите или използващите продукта лица приемат следните условия:

1. Този продукт може да се използва единствено в съответствие с протоколите, предоставени с продукта и настоящото ръководство, както и само с компонентите, включени в набора. QIAGEN не предоставя лиценз във връзка с никоя от интелектуалните си собствениности за използване или включване на приложените компоненти в този набор с каквито и да са компоненти, които не са включени в него, с изключение на описаните в протоколите, предоставени с продукта, ръководството и допълнителните протоколи, които можете да намерите на www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са щателно тествани или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN не дава гаранция за тях и не гарантира, че те не нарушават правата на трети страни.
2. Освен изрично посочените лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
3. Този набор и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, регенерират или препродават.
4. QIAGEN изрично се освобождава от всички други лицензи, изрични или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на набора дават съгласие да не предприемат или позволяват на други лица да предприемат действия, които могат да доведат до или да улесняват някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да приложи забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всичките си разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатски хонорари, при всяко действие за прилагане на Ограниченото лицензно споразумение или някое от правата върху интелектуална собственост, свързани с набора и/или неговите компоненти.

За актуалните условия на лиценза вижте www.qiagen.com.

Този продукт е предназначен за инвитро диагностика. Продуктите QIAGEN не могат да бъдат препродавани, модифицирани за препродажба или използвани за производство на търговски продукти без писмено одобрение на QIAGEN.

Информацията в настоящия документ подлежи на промяна без предизвестие. QIAGEN не поема отговорност за грешки, които могат да се появят в този документ. Счита се, че този документ е пълен и точен към датата на публикуване. В никакъв случай QIAGEN не носи отговорност за инцидентни, специални, многократни или последващи щети във връзка с или възникващи от използването на този документ.

Продуктите QIAGEN са с гаранция, че отговарят на посочените за тях спецификации. Единственото задължение на QIAGEN и единственото средство за защита на клиента са ограничени до безплатна подмяна на продукти, в случай че продуктите нямат работни характеристики като гарантираните.

Купката на този продукт разрешава на купувача да го използва за извършването на диагностични услуги за чужешка инвитро диагностика. Освен горепосоченото изрично право на използване, не се предоставя никакъв общ патент или друг вид разрешение.

Мутацията *IDH1/2* и нейните употреби са защитени с патентни права, включително Европейски патенти EP2326735 и EP2546365, патентни заявки в САЩ US2011229479 и US2012202207 и чуждестранни анализи.

Закупуването на този продукт не носи никакво право за неговото използване за клинични проучвания за лекарства, прицелени към *IDH1/2*. QIAGEN разработва специфични лицензионни програми за такива цели. Моля, свържете се с нашия правен отдел на адрес idllicenses@qiagen.com.

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

1119896 07-2020 HB-1566-005 © 2020 QIAGEN, всички права запазени.

