

červenec 2020

Příručka k soupravě *therascreen*[®] IDH1/2 RGQ PCR Kit



Verze 1

Pro detekci 12 mutací *IDH1* a *IDH2* v gliomu

IVD

Pro diagnostiku in-vitro

Pro použití s přístrojem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R5 **MAT**

1119896CZ

Obsah

Účel použití.....	5
Shrnutí a vysvětlení.....	6
Princip testu.....	8
Dodávané materiály.....	10
Obsah soupravy.....	10
Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy.....	12
Varování a bezpečnostní opatření.....	15
Informace o bezpečnosti.....	15
Všeobecná bezpečnostní opatření.....	15
Skladování činidel a manipulace s nimi.....	17
Podmínky pro přepravu.....	17
Skladování.....	17
Stabilita.....	17
Manipulace se vzorky a jejich uložení.....	18
Postup.....	19
Extrakce a příprava DNA.....	19
Protokol: Detekce mutací <i>IDH1/2</i>	23
Interpretace výsledků.....	28
Kontrola vody.....	28
Kontrola kvality pomocí hodnot C_T kontrol.....	28
Validace vstupu alikvotu.....	31
Výsledky alikvotů.....	31

Řešení potíží	37
Kontrola kvality	40
Omezení	41
Charakteristika funkčních vlastností	43
Hodnoty meze slepého alikvotu (limit of blank, LOB)	43
Limit detekce (limit of detection, LOD)	43
Účinek vstupní hladiny DNA	45
Opakovatelnost a reprodukovatelnost	45
Srovnání metod	48
Literatura	51
Symboly	53
Informace pro objednání	55
Historie revizí dokumentu	57

Účel použití

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je diagnostický test in vitro založený na technologii PCR určený pro kvalitativní detekci 7 mutací genu *IDH1* a 5 mutací genu *IDH2* a pro přímou identifikaci 3 hlavních mutací v DNA extrahované z lidské mozkové tkáně fixované ve formalínu a zalité v parafínu (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE).

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je určena jako pomůcka pro účely klasifikace gliomů.

Shrnutí a vysvětlení

Mutace v genech isocitrát dehydrogenázy (isocitrate dehydrogenase, IDH), *IDH1* a *IDH2*, jsou časté u gliomů II. a III. stupně dle aktuální klasifikace Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) u dospělých pacientů a u sekundárních glioblastomů (glioblastoma, GBM) IV. stupně dle aktuální klasifikace WHO. Kromě diagnostické hodnoty je přítomnost mutací *IDH1/2* spojena s pozitivní prognózou u pacientů s gliomem (1–13).

Souprava *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* je analýzou pro detekci 12 specifických mutací *IDH1/2*: 6 v kodonu 132 genu *IDH1*, 5 v homologním kodonu 172 genu *IDH2* a 1 v kodonu 100 genu *IDH1* (tabulka 1). Souprava také přímo identifikuje hlavní mutace *IDH1* a *IDH2* vedoucí k substitucím *IDH1* R132H, *IDH1* R132C a *IDH2* R172K.

Tabulka 1. Mutace IDH1 a IDH2 detekované pomocí soupravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

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

* Kódy mutací (COSMIC ID) vycházejí z Katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Princip testu

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit poskytuje činidla k provedení 9 samostatných amplifikačních reakcí pro detekci 12 mutací (tabulka 1):

- 3 celkové amplifikační reakce kodonů 132 a 100 genu *IDH1* a kodonu 172 genu *IDH2*
- 3 mutační amplifikační reakce kodonů 132 a 100 genu *IDH1* a kodonu 172 genu *IDH2*
- 3 mutačně specifické amplifikační reakce mutací *IDH1* R132H, *IDH1* R132C a *IDH2* R172K

Celkové reakční směsi

Celkové primery a směsi sond (PPM-Total) používají primery a sondy k amplifikaci jak zmutovaných sekvencí, tak cílových sekvencí divokého typu (obrázek 1).

Reakční směsi pro detekci mutací

Primery a směsi sond pro detekci mutací kombinují primery a sondy tak, aby amplifikovaly jak zmutované sekvence, tak cílové sekvence divokého typu, a navíc oligonukleotid, blokovaný na 3' konci přidáním fosfátové skupiny, která zabraňuje prodlužování (svorka pro PCR), jež je specifické pro cílovou sekvenci divokého typu.

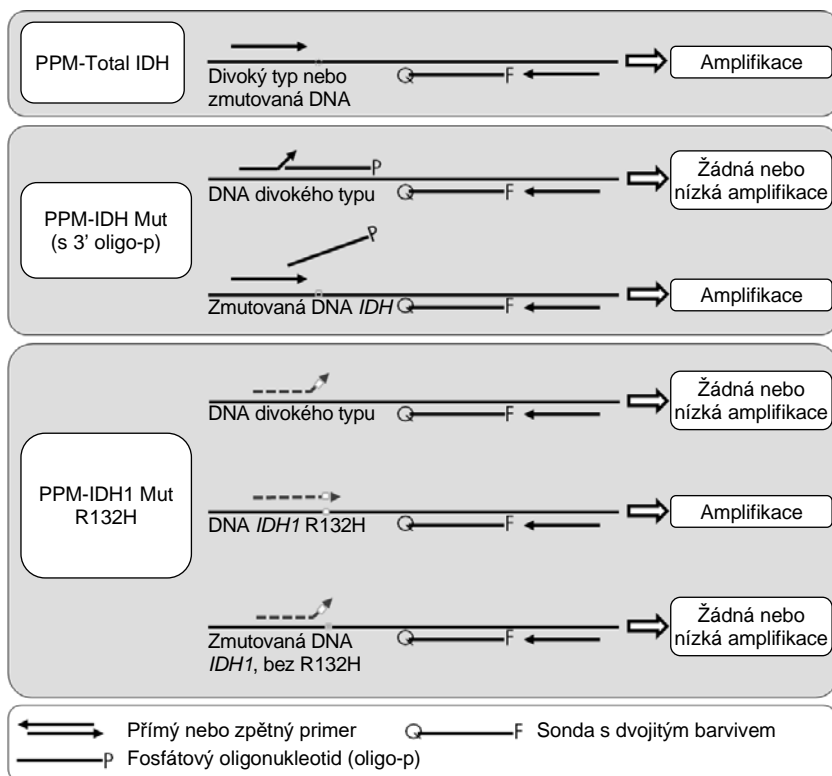
Pokud templát PCR obsahuje sekvenci divokého typu, 3'-fosfátový oligonukleotid bude v důsledku vyšší afinity dominovat nad vazbou primeru PCR. U DNA polymerázy nedochází k žádnému nebo jen k malému prodloužení a není pozorována žádná amplifikace, případně je pozorována pouze nízká amplifikace.

Pokud je přítomna zmutovaná sekvence, bude vazba primeru PCR dominovat nad vazbou 3'-fosfátového oligonukleotidu a amplifikace bude pokračovat (obrázek 1).

Reakční směsi pro identifikaci mutací

Alelicky specifické amplifikace je dosaženo pomocí systému ARMS (Amplification Refractory Mutation System, amplifikační refrakterní mutační systém), který využívá schopnost DNA polymerázy rozlišovat mezi shodou a neshodou na 3'-konci PCR primeru.

Pokud se PCR primer zcela shoduje, amplifikace pokračuje s plnou účinností. Pokud se 3' báze neshoduje, probíhá pouze amplifikace na nízké úrovni v pozadí reakce (obrázek 1).



Obrázek 1. Výsledky získané pomocí primerů a směsí sond v soupravě *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit. Stejný princip jako pro detekci *IDH1* R132H platí i pro *IDH1* R132C a *IDH2* R172K.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalogové číslo		873011
Počet reakcí		20
Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> (Primery a směsi sond pro detekci celkového <i>IDH1/R132</i>) (divoký typ a zmutovaný)	PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Primery a směsi sond pro detekci celkového <i>IDH2/R172</i>) (divoký typ a zmutovaný)	PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Primery a směsi sond pro detekci celkového <i>IDH1/R100</i>) (divoký typ a zmutovaný)	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> (Primery a směs sond (včetně oligo-p) pro detekci zmutovaného <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> (Primery a směs sond (včetně oligo-p) pro detekci zmutovaného <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> (Primery a směs sond (včetně oligo-p) pro detekci zmutovaného <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 (Primery a směs sond pro identifikaci <i>IDH1</i> Mut R132H)	PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x	40 µl

Tabulka pokračuje na další straně

Obsah soupravy (pokračování)

<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalogové číslo		873011
Počet reakcí		20
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132C (Primery a směs sond pro identifikaci <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 (Primery a směs sond pro identifikaci <i>IDH2</i> Mut R172K)	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
<i>IDH1//IDH2</i> Wild Type Genomic DNA (Genomová DNA <i>IDH1//IDH2</i> , divokého typu)	Kontrola <i>IDH1//IDH2</i> , divokého typu	270 µl
<i>IDH1//IDH2</i> Mutated Positive Control (Zmutovaná pozitivní kontrola <i>IDH1//IDH2</i>)	Pozitivní kontrola <i>IDH1//IDH2</i>	270 µl
Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR (Směs <i>Taq</i> DNA polymerázy, dNTP, MgCl ₂ a pufru pro qPCR)	Master Mix pro qPCR 2x	5x 900 µl
Nuclease-Free Water (Voda bez nukleázy)	Voda bez nukleázy	5x 525 µl
Příručka <i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> (anglicky)		1

Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL) které obdržíte od dodavatele výrobku.

Důležité: Zajistěte, aby přístroje používané v tomto postupu byly zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.

Činidla (manuální extrakce DNA)

- Souprava pro extrakci DNA: souprava QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (kat. č. 56404)
- RNase A (17 500 U) (kat. č. 19101)
- Xylen nebo Histolemon™ (Carlo Erba, kat. č. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96–100 %)
- 1× pufr TE, pH 8,0

Činidla (automatická extrakce DNA)

- Souprava pro extrakci DNA: Souprava QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (kat. č. 937236)
- Buffer ATL (kat. č. 19076 nebo 939016)
- RNase A (kat. č. 19101)
- Xylen nebo Histolemon (Carlo Erba, kat. č. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96–100 %)
- 1× pufr TE, pH 8,0

Spotřební materiály

- Skalpely
- Sterilní PCR pipetovací špičky bez nukleázy s aerosolovou bariérou s hydrofobními filtry
- Zkumavky bez nukleázy o objemu 2,0 ml nebo 1,5 ml
- Strip zkumavky s víčky Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, pro přístroj Rotor-Gene Q (kat. č. 981103 nebo 981106)
- Led

Dodatečné spotřební materiály pro automatickou extrakci DNA

- Kazety pro přípravu alikvotů Sample Prep Cartridges, 8-well (kat. č. 997002)
- 8-Rod Covers (kat. č. 997004)
- Filtrační špičky Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (kat. č. 990332) a Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (kat. č. 997024)
- Eluční mikrozukavky Elution Microtubes CL (kat. č. 19588)
- Mikrozukavky Micro tubes 2.0 ml Type H (Sarstedt®, kat. č. 72.693, www.sarstedt.com)

Vybavení

- Stojan na sklíčka a 2 kompatibilní lázně na sklíčka pro xylen/Histolemon a etanol
- Mikrolitrové pipety určené pro PCR (1–10 µl, 10–100 µl, 100–1 000 µl)
- Stolní centrifuga s rotorem pro reakční zkumavky o objemu 0,5 ml / 1,5 ml a mikrodestičky (schopná dosahovat 13 000–14 000 otáček za minutu)
- Stolní třepačka
- Přístroj na provádění real-time PCR: Přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM a související specifický materiál
- Software přístroje Rotor-Gene Q MDx, verze 2.1.0 nebo vyšší
- Biofotometr
- Termomixer, vyhřívaný orbitální inkubátor, topný blok nebo vodní lázeň s možností inkubace při teplotě 56 °C a 90 °C

Přídavné vybavení pro automatickou purifikaci

- Přístroj QIASymphony SP
- Software přístroje QIASymphony SP verze 4.0 nebo vyšší

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in-vitro

Informace o bezpečnosti

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online ve formátu PDF na stránkách www.qiagen.com/safety, kde si uživatelé mohou vyhledat, zobrazit a vytisknout bezpečnostní listy pro každou soupravu QIAGEN a pro každou komponentu příslušné soupravy.

Informace o bezpečnosti pro používanou purifikační soupravu naleznete v odpovídající příručce k soupravě. Informace o bezpečnosti pro přístroje najdete v uživatelské příručce příslušného přístroje.

Všeobecná bezpečnostní opatření

- Tento test je určen k použití s pufrovanými vzorky tkání po chirurgické resekci, které jsou fixované formalínem a zalité v parafínu (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE).
- Veškeré chemikálie a biologické materiály jsou potenciálně nebezpečné. Vzorky a alikvoty jsou potenciálně infekční, a musí se s nimi proto zacházet jako s biologicky nebezpečnými materiály.
- Alikvoty a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.
- Činidla v soupravě *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit jsou optimálně naředěna. Činidla dále neřeďte. Může to mít za následek zhoršení kvality provedení analýzy. Nepoužívejte reakční objemy (reakční směs plus alikvot) nižší než 25 µl.

-
- Všechna reakční činidla dodávaná v soupravě *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit jsou určena k použití výhradně s ostatními činidly dodanými ve stejné soupravě. Nenahrazujte žádná činidla mezi soupravami *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit. Může to mít vliv na funkční vlastnosti.
 - Viz uživatelská příručka pro přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, kde naleznete další varování, bezpečnostní opatření a postupy.
 - Změna inkubace a teplot může mít za následek chybné nebo nesouhlasné údaje.
 - Nepoužívejte součásti s prošlým datem expirace ani nesprávně skladované součásti.
 - U primerů a směsí sond může dojít ke změnám v případě jejich vystavení světlu.
 - Dbejte maximální opatrnosti, aby se zabránilo kontaminaci směsí syntetickými materiály, které jsou obsaženy v činidle pozitivní kontroly.
 - Dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke kontaminaci DNázou, což by mohlo způsobit degradaci templátové DNA.
 - Pro přípravu reakčních směsí a přidávání templátů používejte jednotlivé, k tomuto účelu vyhrazené pipety.
 - Přípravu a rozdělení reakčních směsí provádějte v prostoru odděleném od prostoru používaného k přidávání templátů.
 - Neotevírejte přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, dokud není cyklus testu dokončen.
 - Po dokončení cyklu testu zkumavky Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM neotevírejte.
 - Je nutné dbát opatrnosti, aby bylo zajištěno správné testování alikvotů s důrazem na použití nesprávného alikvotu, chybu plnění a pipetování.

Skladování činidel a manipulace s nimi

Podmínky pro přepravu

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je dodávána na suchém ledu. Pokud není jakákoliv součást soupravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit při dodání zmrzlá, pokud během přepravy došlo k otevření vnějšího obalu anebo pokud zásilka neobsahuje balicí list, příručku nebo činidla, obraťte se na oddělení technických služeb společnosti QIAGEN nebo na místní prodejce (viz stránky www.qiagen.com).

Skladování

Soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit uložte ihned po dodání do mrazničky a skladujte v temnu při konstantní teplotě -30 až -15 °C.

Stabilita

Při uložení dle stanovených podmínek je souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit stabilní do uvedeného data expirace.

Po otevření lze činidla uložit v původních obalech při teplotě -30 až -15 °C až do data expirace uvedeného na obalu. Soupravu opakovaně nerozmrazujte a nezmrazujte. Nepřekračujte maximální počet 5 cyklů zmrazení/rozmrazení.

Manipulace se vzorky a jejich uložení

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je určena k použití s alikvoty DNA extrahovanými z nádorové tkáně, fixované formalínem a zalité v parafínu (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE), které byly odebrané při chirurgické resekci od subjektů s rakovinou mozku. Se všemi alikvoty tkáně se musí zacházet jako s potenciálně nebezpečným materiálem.

- Vzorek tkáně musí být fixován ve 4–10% neutrálním pufovaném formalínu (neutral buffered formalin, NBF).
- Z parafínového bloku je třeba vyříznout sériové řezy o velikosti 10 µm a upevnit je na podložní sklíčka.
- Vyškolená osoba (například patolog) by měla posoudit obsah a oblast nádoru na sousedním řezu obarveném hematoxilynem a eosinem (Hematoxilin & Eosin, H&E). Použijte sériové řezy k extrakci DNA.
- K testu jsou způsobilé pouze řezy s obsahem tumoru $\geq 40\%$.
- U řezů, které obsahují $< 50\text{ mm}^2$ tkáňové oblasti, doporučujeme zpracovat dostatečný počet řezů, které zvýší celkovou tkáňovou oblast na alespoň 50 mm^2 (100 mm^2 pro automatickou extrakci na přístroji QIASymphony SP).
- Vzorky nádoru, bloky, sklíčka a alikvoty připravené k extrakci označujte a manipulujte s nimi a uchovávejte je kontrolovaným způsobem podle místních postupů.
- Bloky FFPE a podložní sklíčka uchovávejte při teplotě místnosti. Sklíčka je možné před extrakcí DNA uchovat při teplotě okolí po dobu až 4 týdnů pro použití se soupravou *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- Po extrakci může být genomová DNA skladována až 1 týden při teplotě 2–8 °C nebo 8 týdnů při teplotě -25 až -15 °C.

Postup

Extrakce a příprava DNA

K purifikaci genomové DNA z alikvotů připravených z FFPE vzorků mozkového nádoru používejte soupravu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat. č. 56404) nebo soupravu QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. č. 937236).

Poznámka: Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit byla validována pouze v kombinaci se soupravou QIAamp DNA FFPE Tissue Kit nebo se soupravou QIASymphony DSP DNA Mini Kit. K extrakci DNA nepoužívejte žádný jiný produkt.

Použití soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

UPOZORNĚNÍ



Pečlivě si projděte následující modifikace, které je třeba provést v protokolu QIAamp.

- Příprava alikvotů před deparafinizací a extrakcí DNA je popsána v části „Výchozí materiál“ v příručce *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook* a Manipulace se vzorky a jejich uložení, stránka 18 v této příručce.
- Souprava QIAamp DNA FFPE Tissue Kit musí být použita pouze ručně.
- Krok RNase popsáný v příručce *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook* musí být proveden.
- Nepoužívejte roztok na odstranění parafínu Deparaffinization Solution společnosti QIAGEN. Pro deparafinizaci používejte pouze metodu s xylenem/etanolem, jak je popsáno v části „Postup deparafinizace sklíčků při použití soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“, dole. Xylen může být nahrazen Histolemonem (náhrada xylenu).
- Rozklad vzorku pomocí proteinázy K musí probíhat 1 hodinu.

- Alikvoty se musejí eluovat dvakrát do 30 µl elučního pufru (Buffer ATE) ze soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Postup deparafinizace sklíčků při použití soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

1. Umístěte sklíčka do konkrétního stojanu na sklíčka.
2. Umístěte stojan se sklíčky na 2 minuty do lázně na sklíčka, která obsahuje xylen nebo Histolemon. Protřepejte 2 nebo 3 pohyby dozadu a dopředu.
3. Umístěte stojan na 2 minuty do druhé lázně na sklíčka, která obsahuje etanol (96–100 %). Protřepejte 2 nebo 3 pohyby dozadu a dopředu.
4. Vysušte sklíčka při teplotě 15–37 °C. To zabere několik minut.
5. Označte mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml pro každý alikvot a do každé zkumavky přidejte 180 µl pufru Buffer ATL (ze soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit).
6. Nakapejte několik kapek pufru Buffer ATL na tkáňové řezy na sklíčkách (dostatečně tak, aby byl povrch tkáně pokryt).
7. Seškrábněte tkáňovou oblast sterilním skalpelem a seškrábanou tkáň přidejte do odpovídající označené mikrocentrifugační zkumavky.
8. Do každé zkumavky přidejte 20 µl proteinázy K (ze soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) a vířením promíchejte.
9. Inkubujte při teplotě 56 °C 1 hodinu.

Pokračujte krokem inkubace při teplotě 90 °C v protokolu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (krok 12 v příručce *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook*, červen 2012, strana 13).

Použití soupravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit

UPOZORNĚNÍ



Pečlivě si projděte následující modifikace, které je třeba provést v listu protokolu QIASymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.

- Příprava alikvotů před deparafinizací a extrakcí DNA je uvedena v části „Manipulace se vzorky a jejich uložení“, strana 18.
- Krok RNase popsáný v listu protokolu QIASymphony SP musí být proveden.
- Nepoužívejte roztok na odstranění parafínu Deparaffinization Solution společnosti QIAGEN. Pro deparafinizaci použijte pouze metodu s xylenem/etanolem, jak je popsáno v části Postup deparafinizace sklíčků při použití soupravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit dole. Xylen může být nahrazen Histolemonem (náhrada xyleny).
- Rozklad vzorku pomocí proteinázy K musí probíhat 1 hodinu.
- Eluční objem 50 µl je třeba zvolit na dotykové obrazovce.

Postup deparafinizace sklíčků při použití soupravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Proveďte deparafinizaci podle následujících kroků, které se liší od listu protokolu QIASymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Umístěte sklíčka do konkrétního stojanu na sklíčka.
2. Umístěte stojan se sklíčky na 2 minuty do lázně na sklíčka, která obsahuje xylen nebo Histolemon. Protřeptejte 2 nebo 3 pohyby dozadu a dopředu.
3. Umístěte stojan na 2 minuty do druhé lázně na sklíčka, která obsahuje etanol (96–100 %). Protřeptejte 2 nebo 3 pohyby dozadu a dopředu.
4. Vysušte sklíčka při teplotě 15–37 °C. To zabere několik minut.
5. Označte mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml pro každý alikvot a do každé zkumavky přidejte 220 µl pufru Buffer ATL.

6. Nakapejte několik kapek pufru Buffer ATL na tkáňové řezy na sklíčkách (dostatečně tak, aby byl povrch tkáně pokryt).
7. Seškrábněte tkáňovou oblast sterilním skalpelem a seškrábanou tkáň přidejte do odpovídající označené mikrocentrifugační zkumavky.
8. Do každé zkumavky přidejte 20 µl proteinázy K (ze soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) a vířením promíchejte.

Pokračujte krokem inkubace při teplotě 56 °C v listu protokolu QIASymphony SP: protokol Tissue_LC_200_V7_DSP (krok 12 v protokolu „Deparafinizace pomocí xylenu“, duben 2012). Inkubujte při teplotě 56 °C 1 hodinu.

Genomová DNA

Genomovou DNA uchovávejte po extrakci při teplotě 2–8 °C po dobu až 1 týdne nebo po dobu 8 týdnů při teplotě -25 až -15 °C.

Množství DNA by mělo být stanoveno měřením optické hustoty (optical density, OD) alikvoty při 260 nm.

Naředte DNA na koncentraci 5 ng/µl v 1× TE pufru při pH 8,0.

Reakce PCR je optimalizována pro alikvoty obsahující 25 ng purifikované genomové DNA.

Protokol: Detekce mutací *IDH1/2*

Důležité body před zahájením používání

- K optimálnímu využití soupravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je nutné alikvoty uspořádat do dávek po 4. V případě menších dávek bude možné soupravou *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit otestovat méně alikvotů.
- Doporučujeme testovat všechny alikvoty jednou během cyklu PCR, jak je uvedeno v tabulce 2, a s rozvržením plnicího bloku a nastavením rotoru, jak je uvedeno v tabulce 3 a na obrázku 2.

Tabulka 2. Počet reakcí pro přístroje Rotor-Gene Q MDx s rotorem na 72 zkumavek

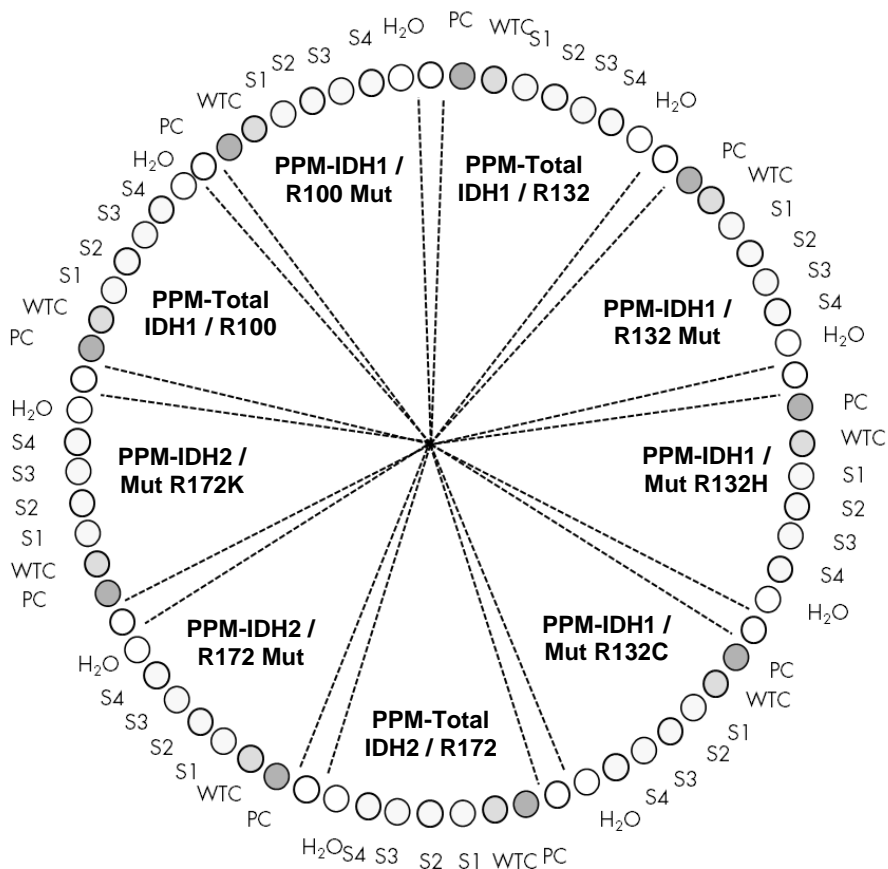
Alikvoty	Reakce
n alikvotů DNA	n × 1 reakce
2 kontroly DNA	2 reakce: pozitivní kontrola a kontrola divokého typu, každá testována jednou během jednoho cyklu PCR
Kontrola vody	1 reakce

Tabulka 3. Navrhovaný plnicí blok pro experiment se soupravou *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*

Alikvot	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
Prázdňá zkumavka	8	16	24	32	40	48	56	64	72

* PC: Positive control (pozitivní kontrola).

† WTC: Wild-type control (kontrola divokého typu).



Obrazek 2. Navrhované nastavení rotoru pro experiment se soupravou *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Důležité: Dbejte na to, abyste vždy umístili alikvot do pozice 1 rotoru. Jinak přístroj neprovede kalibraci a budou získána nesprávná fluorescenční data.

Postup

1. Rozmrazte všechny nezbytné součásti a umístěte je na led.
2. Připravte si následující směsi PCR podle počtu zpracovávaných alikvotů.

Poznámka: Všechny koncentrace jsou pro konečný objem reakce.

Tabulka 4 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi činidel, vypočtené k získání finálního objemu reakce 25 μ l. Pro každou PPM lze podle počtu reakcí připravit premix. Jsou přidány objemy navíc pro kompenzaci chyb při pipetování.

Tabulka 4. Příprava směsí PCR

Složka	1 reakce (μ l)	Pre-mix: 7 + 1 reakcí (μ l)*	Konečná koncentrace
Master Mix pro qPCR 2x	12,5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Voda bez nukleázy	6,5	52	–
Alikvot nebo kontrola† (bude přidán v kroku 4)	5	5 každá	–
Celkový objem	25	25 každá	–

* Připravte 9 předmíchaných směsí (pre-mixů), jednu s každou z PPM dodávaných v soupravě.

† Pozitivní kontrola, negativní kontrola nebo kontrola vody.

3. Do zkumavky Rotor-Gene nadávkujte 20 μ l roztoku pre-mixu (tabulka 3).
4. Přidejte 5 μ l materiálu, který má být kvantifikován (25 ng alikvotu genomové DNA nebo kontroly), do odpovídající zkumavky (celkový objem 25 μ l; tabulka 3).
5. Opatrně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Zkumavky vložte do adaptéru dodávaného s přístrojem (obrázek 2).
Poznámka: Nevyužití pozice je třeba vyplnit prázdnými zkumavkami.
7. Plný adaptér vložte do přístroje Rotor-Gene Q MDx.
8. Naprogramujte přístroj Rotor-Gene Q MDx programem tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5. Teplotní profil

Hold	Teplota: 95 °C
(Výdrž)	Čas: 10 min.
Cycling (Cyklování)	40krát 95 °C po dobu 15 s 60 °C po dobu 60 s se získáním fluorescence FAM™ v kanálu Green: Single

9. Klikněte na možnost **Gain Optimisation** (Optimalizace zisku) v dialogovém okně New Run Wizard (Průvodce novým zpracováním), abyste otevřeli dialogové okno Auto-Gain Optimisation Setup (Nastavení automatické optimalizace zisku). Nastavte rozsah pro zelený kanál (Green) od **2FI** pro **Min Reading** (Minimální odečet) do **10FI** pro **Max Reading** (Maximální odečet).
10. Zaškrtněte políčko **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Provést optimalizaci před 1. akvizicí) a zavřete dialogové okno Auto-Gain Optimisation Setup (Nastavení automatické optimalizace zisku).
11. Spusťte tepelné cyklování.
12. Jakmile tepelné cyklování skončí, proveďte následující.
- 12a. Vyberte položku **Options** (Možnosti) > **Crop Start Cycles** (Smazat cykly startu). Před cyklem **10** data odstraňte, abyste zahodili všechny artefakty.
 - 12b. Vyberte možnost **Analysis** (Analýza) > **Cycling A. Green from 10** (Cycling A. Green, od 10.00), označenou ve zprávě jako „levá prahová hodnota = 10,00“.
 - 12c. Vyberte možnost **Dynamic Tube** (Dynamická zkumavka) jako normalizační metodu a pomocí funkce **Slope Correct** (Oprava směrnice) opravte směrnici šumu.
 - 12d. Funkci **Outlier Removal** (Odstranění odlehlých hodnot) nastavte na **0%** (odpovídá prahové hodnotě NTC).
 - 12e. Funkci **Reaction Efficiency Threshold** (Prahová hodnota účinnosti reakce) nastavte jako deaktivovanou.
 - 12f. Prahovou hodnotu definujte na **0.03**.
 - 12g. Nastavte graf na lineární stupnici.
 - 12h. Vyberte možnost **Digital Filter** (Digitální filtr): **Light** (světlo).

Interpretace výsledků

Kontrola vody

Kontroly vody (beztemplátové kontroly) by měly poskytovat nulové hodnoty C_T pro všechny primery a směsi sond.

Pokud je u kontroly vody získána kladná hodnota C_T , jedná se o výsledek křížové kontaminace. Řešení naleznete v části „Řešení potíží“, strana 37.

Kontrola kvality pomocí hodnot C_T kontrol

Validaci experimentu umožňují kontrola *IDH1/2* divokého typu (wild-type control, WTC) a pozitivní kontrola zmutované *IDH1/2* (Mut-PC).

- Pokud není k dispozici žádná hodnota C_t , je kontrola pro příslušnou detekční analýzu klasifikována jako negativní na mutaci.
- Pokud jsou zjištěny hodnoty C_t , vypočítá se pro každou kontrolu následujícím způsobem ΔC_T .

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

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

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

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

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

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

Kontroly jsou klasifikovány jako pozitivní na mutaci, pokud jsou hodnoty ΔC_T menší než příslušné mezní hodnoty ΔC_T , uvedené v tabulce 6, případně jsou těmito hodnotám rovny. Pokud je hodnota ΔC_T vyšší než mezní hodnota, je kontrola pro uvažovanou analýzu mutací klasifikována jako negativní na mutaci.

Tabulka 6. Mezní hodnoty pro jednotlivé analýzy mutací

Analýza mutací	Mezní hodnota (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

- Kontrola *IDH1/2* divokého typu musí být pro každou analýzu mutací detekována jako negativní na mutaci (tabulka 7).
- Pozitivní kontrola zmutované *IDH1/2* musí být pro každou analýzu mutací detekována jako pozitivní na mutaci (tabulka 7).

Celý experiment je odmítnut, pokud není splněna jedna nebo obě podmínky.

Tabulka 7. Příklad validace cyklu na kontrolách

Hodnota	Voda (No Template Control, NTC)	Kontrola IDH1/IDH2, divokého typu	Pozitivní kontrola IDH1/IDH2
C _T Total IDH1/R132	Nedetekováno	25,45	23,95
C _T IDH1/R132 Mut	Nedetekováno	34,32	25,76
ΔC _T IDH1/R132 Mut	Nedetekováno	8,87	1,81
C _T Total IDH2/R172	Nedetekováno	25,42	24,93
C _T IDH2/R172 Mut	Nedetekováno	34,36	26,36
ΔC _T IDH2/R172 Mut	Nedetekováno	8,94	1,43
C _T Total IDH1/R100	Nedetekováno	26,30	24,69
C _T IDH1/R100 Mut	Nedetekováno	33,04	26,39
ΔC _T IDH1/R100 Mut	Nedetekováno	6,74	1,70
C _T IDH1 Mut R132H	Nedetekováno	35,20	26,48
ΔC _T IDH1 Mut R132H	Nedetekováno	9,75	2,53
C _T IDH1 Mut R132C	Nedetekováno	37,16	27,07
ΔC _T IDH1 Mut R132C	Nedetekováno	11,71	3,12
C _T IDH2 Mut R172K	Nedetekováno	Nedetekováno	27,97
ΔC _T IDH2 Mut R172K	Nedetekováno	–	3,04

Validace vstupu alikvotu

Před interpretací musí být validován vstup alikvotu.

Hodnota C_T získaná pro alikvot s jednotlivými PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ a $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) musí být menší než 32,00. Hodnoty $C_T \text{ Total} \geq 32,00$ jsou způsobeny špatnou kvalitou DNA. Alikvot musí být testován znovu. Jestliže je množství DNA stále nedostatečné, extrahujte více nádorové tkáně, pokud je k dispozici (viz „Řešení potíží“, strana 37).

Výsledky alikvotů

Detekce mutace *IDH1/2*

Pro každý vzorek vypočítejte následujícím způsobem hodnoty ΔC_T získané při každé analýze detekce mutace (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut).

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

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

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

Pokud pro analýzu detekce mutace hodnota C_t neexistuje, musí být vzorek pro uvažovanou mutaci klasifikován jako negativní na mutaci.

Vzorky jsou klasifikovány jako pozitivní na mutaci, pokud je hodnota ΔC_T menší než mezní hodnota ΔC_T příslušné analýzy detekce mutací, která je uvedena v tabulce 8, případně této mezní hodnotě rovna.

Tabulka 8. Mezní hodnoty pro jednotlivé analýzy detekce mutací

Analýza mutací	Mezní hodnota (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5,34
IDH2/R172 Mut	6,42
IDH1/R100 Mut	4,65

Identifikace mutace *IDH1/2*

Pro každý vzorek vypočítejte následujícím způsobem hodnoty ΔC_T získané při každé analýze identifikace mutace (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K).

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

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

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

Pokud pro analýzu identifikace mutace hodnota C_T neexistuje, musí být vzorek klasifikován jako negativní na mutaci.

Mutace vzorku je identifikována, pokud je hodnota ΔC_T menší než mezní hodnota ΔC_T příslušné analýzy identifikace mutací, která je uvedena v tabulce 9, případně této mezní hodnotě rovna. Příklady interpretace hodnoty ΔC_T jsou uvedeny v tabulce 10 a tabulce 11.

Tabulka 9. Mezní hodnoty pro jednotlivé analýzy identifikace mutací

Analýza mutací	Mezní hodnota (ΔC_T)
IDH1 Mut R132H	6,87
IDH1 Mut R132C	7,14
IDH2 Mut R172K	8,49

Tabulka 10. Příklad detekce mutace *IDH1/2*

Hodnota	Alikvot 1	Alikvot 2
C_T Total <i>IDH1/R132</i>	26,39	26,32
C_T <i>IDH1/R132</i> Mut	33,86	28,29
ΔC_T <i>IDH1/R132</i> Mut	7,47	1,97
C_T Total <i>IDH2/R172</i>	26,79	25,79
C_T <i>IDH2/R172</i> Mut	35,13	35,21
ΔC_T <i>IDH2/R172</i> Mut	8,34	9,42
C_T Total <i>IDH1/R100</i>	27,20	27,37
C_T <i>IDH1/R100</i> Mut	33,83	33,76
ΔC_T <i>IDH1/R100</i> Mut	6,63	6,39
Detekce mutace	Mutace nebyla detekována	Detekována mutace R132

Tabulka 11. Příklad identifikace mutace *IDH1/2*

Hodnota	Alikvot 1	Alikvot 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	Nedetekováno
ΔC_T IDH1 Mut R132C	11,55	–
C _T Total IDH2/R172	26,79	25,79
C _T IDH2 Mut R172K	Nedetekováno	Nedetekováno
ΔC_T IDH2 Mut R172K	–	–
Identifikace mutace	Mutace nebyla detekována	Byla detekována mutace pro R132H

Interpretace mutací *IDH1/2*

Postup použitý k přiřazení typu mutace *IDH1/2* alikvotům pozitivním na mutaci *IDH1/2* je uveden v tabulce 12. Příklad interpretace je uveden v tabulce 13.

Tabulka 12. Průvodce interpretací

		Identifikace mutace			
		Detekováno <i>IDH1</i> Mut R132H	Detekováno <i>IDH1</i> Mut R132C	Detekováno <i>IDH2</i> Mut R172K	Mutace nebyla detekována
Detekce mutace	Detekována mutace R132	Detekována mutace R132H	Detekována mutace R132C	–	Mutace R132, ale ani R132H, ani R132C
	Detekována mutace R172	–	–	Detekována mutace R172K	Mutace R172, ale ne R172K
	Detekována mutace R100	–	–	–	R100
	Mutace nebyla detekována	Detekován nízký obsah mutace R132H (mezi 1 % a 2 %)*	Detekován nízký obsah mutace R132C (mezi 1 % a 4 %)*	Detekován nízký obsah mutace R172K (přibližně 1 %)*	Mutace nebyla detekována

* Tyto případy se mohou zřídka vyskytnout a je třeba zkontrolovat všechny alikvoty a technická kritéria přijatelnosti, zejména obsah nádorových buněk. Pokud jsou všechna kritéria splněna, měl by být alikvot otestován znovu.

Tabulka 13. Příklad uvádění a interpretace mutací *IDH1/2*

	Alikvot 1	Alikvot 2
Detekce mutace	Mutace nebyla detekována	Detekována mutace R132
Identifikace mutace	Mutace nebyla detekována	Byla detekována mutace pro R132H
Interpretace výsledků	Nebyla detekována ani identifikována žádná mutace	Mutace R132H

Poznámka: Pokud má alikvot 2 nebo více hodnot ΔC_T menších než mezní hodnoty ΔC_T , případně těmto mezním hodnotám rovné, pak je mutantní stav přiřazen mutaci s největším rozdílem mezi mezní hodnotou a získanou hodnotou ΔC_T . Viz příklad v tabulce 14.

Tabulka 14. Příklad interpretace v případě více pozitivních výsledků

	Alikvot 3	Alikvot 4
ΔC_T <small>IDH1/R132 Mut</small>	1,24	5,24
ΔC_T cutoff <small>IDH1/R132 Mut</small>	5,34	5,34
(ΔC_T cutoff – ΔC_T) <small>IDH1/R132 Mut</small>	4,10	0,10
ΔC_T <small>IDH2/R172 Mut</small>	5,32	5,95
ΔC_T cutoff <small>IDH2/R172 Mut</small>	6,42	6,42
(ΔC_T cutoff – ΔC_T) <small>IDH2/R172 Mut</small>	1,10	0,47
Interpretace výsledků	Mutace R132	Mutace R172

Řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Více informací naleznete na internetových stránkách www.qiagen.com.

Komentáře a návrhy

Ucpaná kolona během extrakce DNA

Neúplná lýza

Opakujte odstředování.

Zbývající lyzát lze přenést do nové kolony.

Opakujte cyklus extrakce s menším množstvím FFPE tkáně.

Nedostatek DNA v eluátu z extrakce

Nedostatečná oblast FFPE tkáně

Opakujte cyklus extrakce s více řezy FFPE tkáně.

Kontrola IDH1/2 divokého typu nebyla detekována

- | | |
|--|---|
| a) Chyby při pipetování nebo vynechaná činidla; obrácení zkumavek nebo jamek | Zkontrolujte pipetovací schéma a nastavení reakce.
Zopakujte cyklus PCR. |
| b) Nevhodné skladování součástí soupravy | Soupravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte při teplotě -30 až -15 °C a primery a směsi sond chraňte před světlem.
Viz „Skladování činidel a manipulace s nimi“, strana 17.

Nepřekračujte maximální počet 5 cyklů zmrazení/rozmrazení. |
| c) Datum expirace soupravy <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit již uplynulo. | Zkontrolujte skladovací podmínky a datum expirace (viz štítek soupravy) reakčních činidel a v případě potřeby použijte novou soupravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |

Komentáře a návrhy

Pozitivní kontrola *IDH1/2* nebyla detekována

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Chyby při pipetování nebo vynechaná činidla; obrácení zkumavek nebo jamek | Zkontrolujte pipetovací schéma a nastavení reakce.

Zopakujte cyklus PCR. |
| b) | Nevhodné skladování součástí soupravy | Soupravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte při teplotě -30 až -15 °C a primery a směsi sond chraňte před světlem.

Viz „Skladování činidel a manipulace s nimi“, strana 17.

Nepřekračujte maximální počet 5 cyklů zmrazení/rozmrazení. |
| c) | Datum expirace soupravy <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit již uplynulo. | Zkontrolujte skladovací podmínky a datum expirace (viz štítek soupravy) reakčních činidel a v případě potřeby použijte novou soupravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |

Žádný signál, včetně žádného signálu pro kontroly

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Žádná reakční zkumavka v pozici 1 přístroje Rotor-Gene Q MDx | Dbejte na to, abyste vždy umístili alikvot do pozice 1 rotoru. Jinak přístroj neprovede kalibraci a budou získána nesprávná fluorescenční data. |
| b) | Chyby při pipetování nebo vynechaná činidla; obrácení zkumavek nebo jamek | Zkontrolujte pipetovací schéma a nastavení reakce.

Zopakujte cyklus PCR. |
| c) | Nevhodné skladování součástí soupravy | Soupravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte při teplotě -30 až -15 °C a primery a směsi sond chraňte před světlem.

Viz „Skladování činidel a manipulace s nimi“, strana 17.

Nepřekračujte maximální počet 5 cyklů zmrazení/rozmrazení. |
| d) | Datum expirace soupravy <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit již uplynulo. | Zkontrolujte skladovací podmínky a datum expirace (viz štítek soupravy) reakčních činidel a v případě potřeby použijte novou soupravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |

Komentáře a návrhy

Negativní kontrola (H₂O) dává pozitivní výsledek

Křížová kontaminace,
kontaminace činidel, chyba
přístroje, obrácení jamky nebo
kapiláry, případně poškození
sondy

Vyměňte všechna kriticky důležitá činidla nebo použijte novou soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

S alikvoty, součástmi soupravy a spotřebním materiálem vždy zacházejte v souladu s běžně přijímanou praxí, aby nedošlo k přenosu kontaminace.

Primery a směsi sond uchovávejte mimo dosah světla.

Zkontrolujte falešně pozitivní výsledky na fluorescenčních křivkách.

Zkontrolujte nastavení reakce. Viz „Protokol: Detekce mutací IDH1/2“, strana 23.

Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže soupravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita výrobku. Certifikáty analýzy jsou k dispozici na požádání na stránkách www.qiagen.com/support/.

Omezení

Tato souprava je určena pro profesionální použití.

Tento výrobek je určen k použití personálem speciálně instruovaným a vyškoleným v technikách molekulární biologie, který je důkladně obeznámen s touto technologií.

Tato souprava musí být použita dle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovaným přístrojem uvedeným v části „Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy“ na straně 12.

Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých součástí. Nepoužívejte součásti po datu expirace.

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je validována pouze pro pufrovanou mozkovou tkáň, fixovanou ve formalínu a zalitou v parafínu.

Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je validována pouze pro použití se soupravou QIAamp DNA FFPE Tissue Kit nebo se soupravou QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Byl validován pouze přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (pro PCR) a přístroj QIASymphony SP (pro přípravu vzorků).

Jakékoli jiné než určené použití tohoto výrobku a/nebo úprava součástí zbaví společnost QIAGEN odpovědnosti.

Každý uživatel je zodpovědný za validaci funkčních vlastností systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčních vlastností výrobků QIAGEN.

Test je určen k detekci 7 mutací v kodonech 132 a 100 genu *IDH1* a 5 mutací v kodonu 172 genu *IDH2*. Vzorky s výsledky uvedenými jako „No mutation detected“ (Mutace nebyla detekována) mohou ukrývat mutace *IDH1* či *IDH2* nedetekované touto analýzou.

Detekce mutací závisí na celistvosti alikvotu, obsahu tumoru a množství amplifikovatelné DNA přítomné ve vzorku.

Veškeré diagnostické výsledky generované pomocí tohoto výrobku je nutné interpretovat v kontextu veškerých relevantních klinických a laboratorních nálezů.

Charakteristika funkčních vlastností

Hodnoty meze slepého alikvotu (limit of blank, LOB)

Mez slepého alikvotu (limit of blank, LOB) (podle směrnice CLSI/NCCLS EP17-A; 14) byla stanovena u negativních alikvotů (FFPE normální mozek, 8 alikvotů, 64 měření/šarže, 2 šarže).

Výsledky LOB jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15. Hodnoty meze slepého alikvotu (limit of blank, LOB)

Analýza	LOB	Konečná hodnota LOB
R132 Mut	Validační šarže 1: 6,57 Validační šarže 2: 6,32	6,32
R132H Mut	Validační šarže 1: 7,91 Validační šarže 2: 8,22	7,91
R132C Mut	Validační šarže 1: 8,04 Validační šarže 2: 8,20	8,04
R172 Mut	Validační šarže 1: 7,74 Validační šarže 2: 7,59	7,59
R172K Mut	Validační šarže 1: 9,93 Validační šarže 2: 10,58	9,93
R100 Mut	Validační šarže 1: 6,52 Validační šarže 2: 5,19	5,17

Limit detekce (limit of detection, LOD)

Limit detekce (limit of detection, LOD; též analytická citlivost) byl stanoven na základě „přístupu profilu přesnosti“ popsaného ve směrnici CLSI/NCCLS EP17-A (14). Na jednu mutaci bylo použito pět nízko pozitivních alikvotů (plazmidová DNA doplněná do DNA divokého typu gliomu) (30 až 110 měření pro jeden typ mutace a procento mutace).

Výsledky LOD jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16. Limit detekce (limit of detection, LOD)

Analýza	Mutace	LOD	Mezní hodnota analýzy	Citlivost (%)
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

Mutace je detekována, pokud je hodnota ΔC_T menší než hodnota LOD, případně této hodnotě rovna.

Účinek vstupní hladiny DNA

DNA byla extrahována z 4 různých alikvotů gliomu: 2 s divokým typem *IDH1/2* a 2 nesoucí mutaci *IDH1* R132H (395G>A).

Byla testována tři různá množství DNA (včetně doporučeného pro protokol), aby se vyhodnotil dopad vstupní hladiny DNA na kvalitativní výsledky. Výsledky ukázaly, že vstupní hladina DNA neměla na kvalitativní výsledky žádný vliv. Nicméně u vstupní hladiny DNA nižší, než je doporučeno (< 25 ng DNA), bylo zaznamenáno více technických selhání (selhání kontroly kvality pro C_T Total). Proto se pro provedení testu doporučuje vstupní hladina DNA 25 ng v objemu 5 μ l.

Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Studie přesnosti byla provedena na 4 různých alikvotech (plazmidová DNA doplněná do DNA gliomu divokého typu, zastupující divoký typ (wild-type, WT), mutantní a mezní alikvot), které byly testovány 40krát v duplikátu (n = 80 měření).

Směrodatné odchylky (standard deviations, SD) a variační koeficienty (coefficients of variation, CV) jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 17. Přesnost výsledků

Analyza	Alikvot	Střední hodnota ΔC_T	SD _R *	SD _{Run} [†]	SD _{Total} [‡]	CV _{Total} (%) [‡]	Míra správných detekcí
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: Repeatability (Opakovatelnost).

† Cyklus: Reprodukovanost mezi cykly.

‡ Celkem: Celková přesnost (včetně mezi přístroji, mezi pracovníky obsluhy a mezi šaržemi).

Tabulka pokračuje na další straně

Tabulka 17. Přesnost výsledků (pokračování)

Analyza	Alikvot	Střední hodnota ΔC_T	SD _R *	SD _{Run} [†]	SD _{Total} [‡]	CV _{Total} (%) [‡]	Míra správných detekcí
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: Repeatability (Opakovatelnost).

[†] Cyklus: Reprodukovatelnost mezi cykly.

[‡] Celkem: Celková přesnost (včetně mezi přístroji, mezi pracovníky obsluhy a mezi šaržemi).

Srovnání metod

Srovnání s imunohistochemií (immunohistochemistry, IHC) pro detekci *IDH1/R132H*.

Byla provedena studie, která prokázala shodu mezi stavem mutace, jak byl vyhodnocen pomocí soupravy *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* a pomocí IHC (klon H09 protilátky proti lidské *IDH1R132H*, DIANOVA).

Bylo vybráno celkem 103 klinických alikvotů gliomu. Nejstaršímu bloku bylo 10 let.

Všechny bloky prošly kontrolou kvality jak pro soupravu *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*, tak pro IHC.

Výsledky prokázaly míru pozitivní shody (positive percentage agreement, PPA) 100 %, míru negativní shody (negative percent agreement, NPA) 98 %, a celkovou míru shody (overall agreement, OA) 99 % (tabulka 18).

Tabulka 18. Analýza shody mezi soupravou theascreen RGQ PCR Kit a IHC

Míra shody	Frekvence (%)	95% interval spolehlivosti
PPA	45/45 (100%)	[92;100]
NPA	57/58 (98%)	[91;100]
OA	102/103 (99%)	[96;100]

Srovnání s obousměrným sekvenováním

Byla provedena studie, která prokázala shodu mezi stavem mutace, jak byl vyhodnocen pomocí soupravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit a pomocí obousměrné sekvenační metody.

Bylo vybráno celkem 103 klinických alikvotů tumoru od pacientů s gliomem. Nejstaršímu bloku bylo 10 let.

Všech 103 vzorků prošlo kontrolami kvality pro soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit a 101 vzorků vrátilo výsledky pro obousměrné sekvenování.

Výsledky prokázaly míru pozitivní shody (positive percentage agreement, PPA) 100 %, míru negativní shody (negative percent agreemen, NPA) 92 % a celkovou míru shody (overall agreement, OA) 96% (tabulky 19 a 20).

Tabulka 19. Souprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit vs. obousměrná sekvenační metoda

		Obousměrné sekvenování Sangerovou metodou				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT
therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172†	0	0	0	0	1
	WT	0	0	0	0	47

* R132 znamená, že v alikvotu byla zjištěna mutace R132, ale ani R132H, ani R132C.

† R172 znamená, že v alikvotu byla zjištěna mutace R172, ale ne R172K.

Tabulka 20. Analýza shody s obousměrným sekvenováním

Míra shody	Frekvence (%)	95% interval spolehlivosti
PPA	50/50 (100%)	[93;100]
NPA	47/51 (92%)	[81;97]
OA	97/101 (96%)	[90;98]

Literatura

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).

Symbols

Následující tabulka obsahuje symboly, které mohou být uvedeny na označení nebo v tomto dokumentu.



<N>

Obsahuje dostatek činidel pro <N> reakcí



Použijte do



Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu (tj. označení dílu)



Součásti (tj. seznam dodávaných součástí)



Obsahuje (obsah)



Počet (tj. injekční lahvičky, lahvičky)

Rn

R označuje revizi příručky a n je číslo revize



Globální číslo obchodní položky



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití



Upozornění

Informace pro objednání

Výrobek	Obsah	Kat. č.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	Pro 20 reakcí: 9 směsí primerů a sond, kontrola divokého typu, pozitivní kontrola, Master Mix, voda bez nukleázy	873011
Přístroj Rotor-Gene Q MDx a příslušenství		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cyklér pro real-time PCR a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cyklér pro real-time PCR s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis bez instalace a školení	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce pomocí jednonábové pipety s využitím zkumavek 72x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s víčky, pro 1 000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10x 250 stripů po 4 zkumavkách s víčky na 10 000 reakcí	981106
Souprava QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – pro purifikaci genomové DNA z tkání zalitých v parafínu		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pro přípravu 50 vzorků DNA: 50 kolonek QIAamp MinElute® Columns, proteináza K, puřry, sběrné zkumavky Collection Tubes (2 ml)	56404
QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit – pro automatickou purifikaci DNA z 1–96 vzorků		
QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Pro 192 preparátů, každý po 200 µl: obsahuje 2 kazety s reagensy, stojany na enzymy a příslušenství	937236

Výrobek	Obsah	Kat. č.
Přístroj QIASymphony SP a příslušenství		
QIASymphony SP System	Modul pro přípravu alikvotů QIASymphony: zahrnuje instalaci a školení a roční záruku na všechny části a provedení	9001751
QIASymphony SP	Modul pro přípravu alikvotů QIASymphony: zahrnuje roční záruku na všechny části a provedení	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8jamkové kazety pro přípravu alikvotů pro použití s přístrojem QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Víčka 8-Rod Covers pro použití v přístroji QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Špičky s filtrem na jedno použití, ve stojanech; (8x 128). Pro použití s přístroji QIAcube a QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Špičky s filtrem na jedno použití, ve stojanech; (8x 128). Pro použití s přístroji QIASymphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Nesterilní polypropylenové zkumavky (maximální kapacita 0,85 ml, kapacita pro uchovávání méně než 0,7 ml, eluční kapacita 0,4 ml); 2 304 ve stojanech po 96; včetně stripů s víčky	19588
Činidla		
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7 000 jednotek/ml, roztok)	19101
Buffer ATL (200 ml)	Tkáňový lýzový pufr, 200 ml, pro 1 000 preparátů	19076

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro soupravu QIAGEN nebo uživatelské příručce. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Historie revizí dokumentu

Datum	Změny
R5, červenec 2020	<p>Revidovaná část Interpretace výsledků, do níž byly doplněny informace týkající se klasifikace kontrol a alikvotů v závislosti na detekci hodnoty Ct</p> <p>Revidovaný sloupec Kontrola IDH1/IDH2 divokého typu v tabulce 7 pro C_T IDH Mut R172K a ΔC_T IDH2 Mut R172K</p> <p>Revidované sloupce Alikvot 1 a Alikvot 2 v tabulce 11 pro C_T IDH1 Mut R132C, ΔC_T IDH1 Mut R132C, C_T IDH2 Mut R172K, a ΔC_T IDH2 Mut R172K</p>

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná.

Omezená licenční smlouva pro soupravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Používáním tohoto výrobku vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze se součástmi dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmkoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsaných v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato souprava a/nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této soupravy souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti anebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat základy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

Tento výrobek je určen pro diagnostiku in vitro. Výrobky společnosti QIAGEN nesmí být dále prodávány, upravovány pro další prodej ani použity pro výrobu komerčních výrobků bez písemného schválení společnosti QIAGEN.

Informace v tomto dokumentu se mohou měnit bez předchozího upozornění. Společnost QIAGEN nepřebírá odpovědnost za jakékoliv chyby, které se mohou vyskytnout v tomto dokumentu. Tento dokument je považován za úplný a přesný v době publikace. Společnost QIAGEN nenese za žádných okolností odpovědnost za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo následné škody v souvislosti nebo vyplývající z použití tohoto dokumentu.

Na výrobky společnosti QIAGEN se vztahuje záruka, že splňují uváděné specifikace. Výhradní uvážení společnosti QIAGEN a náhrada zákazníkovi je omezeno na bezplatnou výměnu výrobku v případě, že výrobek nesplní vlastnosti dle záruky.

Koupě tohoto výrobku opravňuje kupujícího k jeho užítí k provedení diagnostických služeb pro humánní diagnostiku in vitro. Tímto není udělen žádný všeobecný patent ani jiná licence jakéhokoliv druhu, s výjimkou tohoto specifického práva k použití po koupi.

Mutace IDH1/2 a jejich použití jsou chráněny patentovými právy, včetně evropských patentových přihlášek EP23226735 a EP2546365, amerických patentových přihlášek US2011229479 a US2012202207 a zahraničních protějšků.

Nákup tohoto výrobku nezaručuje žádná práva na jeho použití v klinických hodnoceních pro léky zacílené na *IDH1/2*. Společnost QIAGEN vytváří pro taková použití specifické licenční programy. Obratse se prosím naše právní oddělení na adrese idllicenses@qiagen.com.

Ochranné známky: QIAGEN®, QIAamp®, QIAAsymphony®, MinElute®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM™ (Life Technologies Corporation); Histiolemon™ (Carlo Erba); Sarstedt® (Sarstedt AG).

1119896 07-2020 HB-1566-005 © 2020 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

