

júl 2020

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



Verzia 1

Na detekciu 12 mutácií *IDH1* a *IDH2* v glióme

IVD

Na diagnostické použitie in vitro

Na použitie s prístrojom Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMECKO

R5

MAT

1119896SK

Obsah

Účel použitia	5
Súhrn a vysvetlenie	6
Princíp postupu	8
Dodávané materiály.....	10
Obsah súpravy	10
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú.....	12
Varovania a preventívne opatrenia.....	14
Bezpečnostné informácie	14
Všeobecné bezpečnostné opatrenia	14
Skladovanie a manipulácia s reagensiami.....	16
Podmienky prepravy	16
Skladovanie.....	16
Stabilita	16
Skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi	17
Postup	18
Extrakcia a príprava DNA.....	18
Protokol: Detekcia mutácií <i>IDH1/2</i>	22
Interpretácia výsledkov.....	27
Kontroly vody	27
Kontrola kvality pomocou hodnôt kontrol C_T	27
Validácia vstupu vzorky.....	30
Výsledky vzoriek	30

Sprievodca riešením problémov	36
Kontrola kvality	39
Obmedzenia	40
Charakteristiky účinnosti.....	42
Limit slepého pokusu (Limit of blank, LOB).....	42
Limit detekcie (Limit of detection, LOD).....	42
Účinok vstupu DNA	44
Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť.....	44
Porovnanie metód	47
Referenčná literatúra	50
Symboly.....	52
Informácie o objednávaní	54
História úprav dokumentu.....	56

Účel použitia

Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je diagnostický test in vitro založený na technológii PCR určený na kvalitatívnu detekciu 7 mutácií génu *IDH1* a 5 mutácií génu *IDH2* a na priamu identifikáciu 3 hlavných mutácií v extrahovanej DNA z ľudského mozgového tkaniva fixovaných formaldehydom a zaliatych do parafínu (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE).

Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je určená na použitie ako pomôcka na klasifikáciu gliómov.

Súhrn a vysvetlenie

Mutácie v génoch izocitrátu dehydrogenázy (isocitrate dehydrogenase, IDH), *IDH1* a *IDH2* sú časté u dospelých gliómov stupňa II a III Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) a sekundárnych glioblastómov (glioblastomas, GBM) stupňa WHO IV. Okrem diagnostickej hodnoty je prítomnosť mutácií *IDH1/2* spojená s pozitívnou prognózou pacientov s gliómom (1 – 13).

Súprava *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* je test na detekciu 12 špecifických mutácií *IDH1/2*: 6 v kodóne 132 génu *IDH1*, 5 v homológnom kodóne 172 *IDH2* a 1 v kodóne 100 *IDH1* (Tabuľka 1). Súprava tiež priamo identifikuje hlavné mutácie *IDH1* a *IDH2* vedúce k substitúciám *IDH1* R132H, *IDH1* R132C a *IDH2* R172K.

Tabuľka 1. Mutácie IDH1 a IDH2 detegované pomocou súpravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Gén	Mutácia	Zmena bázy	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

* Identifikátory COSMIC ID pochádzajú z katalógu somatických mutácií pri rakovine (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Princíp postupu

Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit obsahuje reagenty na vykonanie 9 samostatných amplifikačných reakcií na detekciu 12 mutácií (Tabuľka 1):

- 3 celkové amplifikačné reakcie kodónov 132 a 100 génu *IDH1* a kodónu 172 génu *IDH2*
- 3 mutačné amplifikačné reakcie kodónov 132 a 100 génu *IDH1* a kodónu 172 génu *IDH2*
- 3 mutačne špecifické amplifikačné reakcie mutácií *IDH1* R132H, *IDH1* R132C a *IDH2* R172K

Celkové reakčné zmesi

Celkové zmesi primérov a sond (Celkové PPM) používajú priméry a sondy na amplifikáciu mutovaných aj divých typov cieľových sekvencií (Obrázok 1).

Reakčné zmesi na detekciu mutácií

Zmesi primérov a sond na detekciu mutácií kombinujú priméry a sondy na amplifikáciu mutovaných aj divých typov cieľových sekvencií plus oligonukleotid 3' blokovaný pridaním fosfátovej skupiny, aby sa zabránilo predĺženiu (svorky PCR), ktoré je špecifické pre cieľovú sekvenciu divého typu.

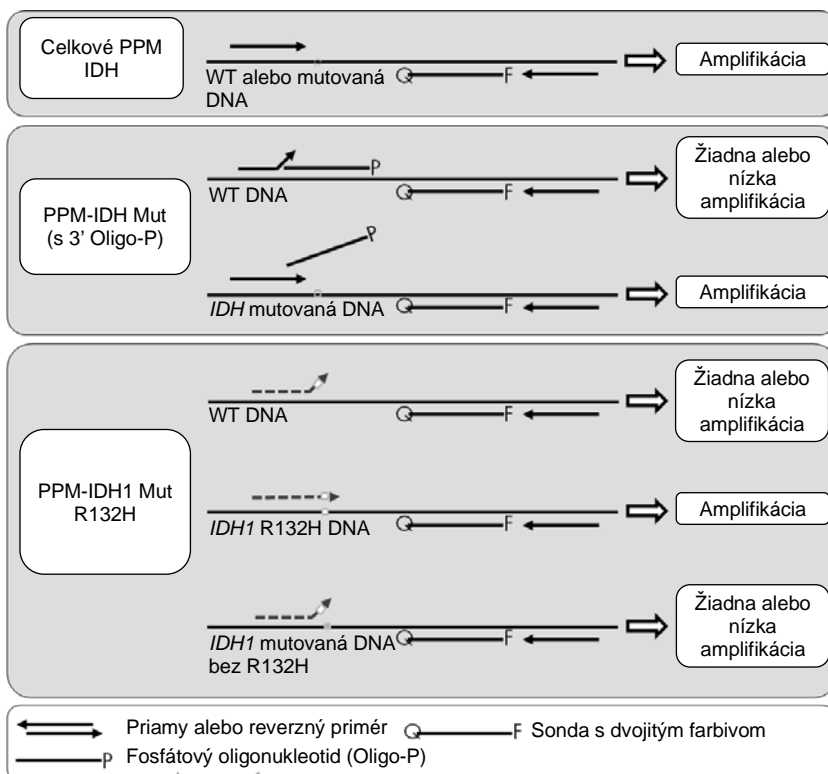
Keď šablóna PCR obsahuje sekvenciu divého typu, 3'-fosfátový oligonukleotid bude dominovať nad väzbou priméru PCR kvôli vyššej afinite. DNA polymeráza nevykazuje žiadne alebo len malé predĺženie a nepozorovala sa žiadna alebo nízka amplifikácia.

Keď je prítomná mutovaná sekvencia, väzba priméru PCR bude dominovať nad väzbou 3'-fosfátového oligonukleotidu a bude prebiehať amplifikácia (Obrázok 1).

Reakčné zmesi na identifikáciu mutácií

Alelovo špecifická amplifikácia sa dosahuje pomocou amplifikačného refrakčného mutačného systému (Amplification Refractory Mutation System, ARMS), ktorý využíva schopnosť DNA polymerázy rozlišovať medzi zhodou a nesúlodom na 3' konci PCR priméru.

V prípade úplnej zhody priméru PCR pokračuje amplifikácia s plnou účinnosťou. Ak na 3' báze nedôjde k zhode, uskutoční sa iba amplifikácia nízkej úrovne (Obrázok 1).



Obrázok 1. Výsledky získané so zmesami primérov a sond v súprave *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit. Rovnaký princíp, ktorý sa určil na detekciu *IDH1* R132H platí pre *IDH1* R132C a *IDH2* R172K.

Dodávané materiály

Obsah súpravy

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalógové číslo		873011
Počet reakcií		20
Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> (Zmes primérov a sond na detekciu celkového <i>IDH1/R132</i>) (divého typu a mutovaný)	Celkové PPM <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Zmes primérov a sond na detekciu celkového <i>IDH2/R172</i>) (divého typu a mutovaný)	Celkové PPM <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Zmes primérov a sond na detekciu celkového <i>IDH1/R100</i>) (divého typu a mutovaný)	Celkové PPM <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R132</i> (Zmes primérov a sond (vrátane Oligo-P) na detekciu mutovaného <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> (Zmes primérov a sond (vrátane Oligo-P) na detekciu mutovaného <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> (Zmes primérov a sond (vrátane Oligo-P) na detekciu mutovaného <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 (Zmes primérov a sond na identifikáciu <i>IDH1</i> Mut R132H)	PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x	40 µl

Tabuľka pokračuje na nasledujúcej strane

Obsah súpravy (pokračovanie)

<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalógové číslo		873011
Počet reakcií		20
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132C (Zmes primérov a sond na identifikáciu <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 (Zmes primérov a sond na identifikáciu <i>IDH1</i> Mut R172K)	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Wild Type Genomic DNA (Genomická DNA divého typu <i>IDH1/IDH2</i>)	Kontrola <i>IDH1/IDH2</i> WT	270 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Mutated Positive Control (Mutovaná pozitívna kontrola <i>IDH1/IDH2</i>)	Pozitívna kontrola <i>IDH1/IDH2</i>	270 µl
Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR (Zmes polymerázy <i>Taq</i> DNA, dNTP, MgCl ₂ a pufru pre qPCR)	Hlavná zmes qPCR, 2x	5 x 900 µl
Nuclease-Free Water (Voda bez nukleázy)	Voda bez nukleázy	5 x 525 µl
Príručka k súprave <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (angličtina)		1

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Dôležité: Overte, či boli zariadenia použité v tomto postupe skontrolované a kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.

Reagencia (manuálna extrakcia DNA)

- Súprava na extrakciu DNA: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (kat. č. 56404)
- RNase A (17 500 U) (kat. č. 19101)
- Xylene alebo Histolemon™ (Carlo Erba, kat. č. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96 – 100 %)
- 1x pufer TE, pH 8.0

Reagencia (automatická extrakcia DNA)

- Súprava na extrakciu DNA: QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (kat. č. 937236)
- Buffer ATL (kat. č. 19076 alebo 939016)
- RNase A (kat. č. 19101)
- Xylene alebo Histolemon (Carlo Erba, kat. č. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96 – 100 %)
- 1x pufer TE, pH 8.0

Spotrebný materiál

- Skalpely
- Sterilné špičky PCR pipiet bez obsahu nukleáz odolné voči aerosólom s hydrofóbnymi filtrami

- 2,0 ml alebo 1,5 ml skúmavky bez nukleázy
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml pre Rotor-Gene Q (kat. č. 981103 alebo 981106)
- Ľad

Ďalší spotrebný materiál pre automatizovanú extrakciu DNA

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

Zariadenie

- Stojan na sklíčka a 2 kompatibilné kúpele na sklíčka pre xylén/Histolemon a etanol
- Mikrolitrové pipety určené na PCR (1 – 10 µl; 10 – 100 µl; 100 – 1000 µl)
- Stolná odstredivka s rotorom pre reakčné skúmavky a mikrodoštičky s objemom 0,5 ml/1,5 ml (schopná dosiahnuť 13 000 – 14 000 ot/min)
- Stolný vortex
- Prístroj na real-time PCR: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM a súvisiaci špecifický materiál
- Rotor-Gene Q MDx softvérová verzia 2.1.0 alebo vyššia
- Biofotometer
- Termomixér, vyhrievaný orbitálny inkubátor, ohrievacie teleso alebo vodný kúpeľ schopný inkubácie pri teplote 56 až 90 °C

Ďalšie vybavenie na automatizovanú purifikáciu

- Prístroj QIASymphony SP
- QIASymphony SP softvérová verzia 4.0 alebo vyššia

Varovania a preventívne opatrenia

Na diagnostické použitie in vitro

Bezpečnostné informácie

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii online vo formáte PDF na adrese **www.qiagen.com/safety**, kde môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačiť SDS pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

Bezpečnostné informácie pre použitú purifikačnú súpravu nájdete v príslušnej príručke k súprave. Bezpečnostné informácie týkajúce sa prístrojov nájdete v príslušnej používateľskej príručke k prístroju.

Všeobecné bezpečnostné opatrenia

- Test je určený na použitie s pufrovanými vzorkami chirurgickej resekcie fixovanými formaldehydom a zaliatymi do parafínu (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE).
- Všetky chemikálie a biologické materiály sú potenciálne nebezpečné. Vzorky sú potenciálne infekčné a musí sa s nimi zaobchádzať ako s biologicky nebezpečnými materiálmi.
- Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných postupov.
- Reagencie pre súpravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit sú optimálne zriedené. Reagencie ďalej neriedte, pretože by to mohlo viesť k strate výkonu. Nepoužívajte reakčné objemy (reakčná zmes a vzorka) menšie ako 25 µl.
- Všetky reagencie dodávané v súprave *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit sú určené na použitie výhradne s ostatnými reagentami dodávanými v tej istej súprave.

Nenahrádzajte žiadne reagentami medzi súpravami *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kits, pretože by sa tým mohol ovplyvniť výkon.

- Ďalšie varovania, preventívne opatrenia a postupy nájdete v používateľskej príručke k prístroju Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Zmena inkubácie a teplôt môže viesť k chybným alebo nezhodným údajom.
- Nepoužívajte exspirované alebo nesprávne skladované komponenty.
- Zmesi primérov a sond sa môžu pri vystavení svetlu zmeniť.
- Buďte mimoriadne opatrní, aby ste zabránili kontaminácii zmesí syntetickými materiálmi, ktoré sú obsiahnuté v reagentii na pozitívnu kontrolu.
- Buďte mimoriadne opatrní, aby ste zabránili kontaminácii DNázou, ktorá by mohla spôsobiť degradáciu šablónovej DNA.
- Na nastavenie reakčných zmesí a pridávanie šablón používajte samostatné špeciálne pipety.
- Príprava a výdaj reakčných zmesí sa vykonáva v oblasti oddelenej od oblasti použitej na pridanie šablón.
- Neotvárajte prístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, kým nie je dokončený cyklus.
- Po ukončení cyklu neotvárajte skúmavky Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Je potrebné postupovať opatrne, aby sa zaistilo správne testovanie vzorky s dôrazom na nesprávne vloženie vzorky, chybu nakladania a chybu pipetovania.

Skladovanie a manipulácia s reagensiami

Podmienky prepravy

Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit sa dodáva na suchom ľade. Ak niektorý komponent zo súpravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit v čase prijímu nie je zmrazený, vonkajší obal bol počas prepravy otvorený, dodávka neobsahuje prepravný list, príručku alebo reagentie, obráťte sa na technické služby spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora (pozri www.qiagen.com).

Skladovanie

Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit by sa mala ihneď po prijatí skladovať pri teplote -30 až -15 °C v mrazničke s konštantnou teplotou a chránená pred svetlom.

Stabilita

Pri skladovaní za stanovených podmienok skladovania je súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit stabilná až do uvedeného dátumu expirácie.

Po otvorení sa reagentie môžu skladovať v pôvodnom obale pri teplote -30 až -15 °C až do uvedeného dátumu expirácie uvedeného na obale. Malo by sa zabrániť opakovanému rozmrazeniu a zmrazeniu. Neprekračujte maximálne 5 cyklov zmrazenia a rozmrazenia.

Skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi

Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit je určená na použitie so vzorkami DNA extrahovanými nádorového tkaniva fixovaného formaldehydom a zaliateho do parafínu (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) z chirurgických resekcí odobratých pacientom s rakovinou mozgu. Všetky vzorky tkaniva by sa mali považovať za potenciálne nebezpečné.

- Vzorka tkaniva musí byť zafixovaná v 4 – 10 % neutrálnom pufrovanom formalíne (neutral buffered formalin, NBF).
- Sériové sekcie s veľkosťou 10 µm sa musia vyrezať z parafínového bloku a namontovať na sklenené sklíčka.
- Vyškolená osoba (napríklad patológ) by mal posúdiť obsah a plochu nádoru na susednom mieste sfarbenom hematoxylinom a eozínom (H&E). Na extrakciu DNA používajte sériové sekcie.
- Na test sú vhodné iba sekcie s obsahom nádoru $\geq 40\%$.
- V prípade sekcií obsahujúcich tkanivovú plochu $< 50\text{ mm}^2$, odporúčame spracovať dostatočný počet sekcií, aby sa zvýšila celková plocha tkanív aspoň na 50 mm^2 (100 mm^2 pri automatickej extrakcii na QIASymphony SP).
- Vzorky tumoru, bloky, sklíčka a vzorky pripravené na extrakciu označte, manipulujte s nimi a uskladnite ich kontrolovaným spôsobom podľa miestnych postupov.
- Bloky FFPE a sklíčka skladujte pri izbovej teplote. Sklíčka sa môžu pred extrakciou DNA skladovať pri teplote okolia až 4 týždne na použitie so súpravou *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- Po extrakcii sa môže genomická DNA skladovať až 1 týždeň pri teplote 2 – 8 °C alebo 8 týždňov pri teplote –25 až –15 °C.

Postup

Extrakcia a príprava DNA

Na purifikáciu genómovej DNA pripravenú zo vzoriek rakoviny mozgu FFPE použite súpravu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat. č. 56404) alebo QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. č. 937236).

Poznámka: Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit bola overená iba v kombinácii so súpravou QIAamp DNA FFPE Tissue Kit alebo QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Nepoužívajte žiadny iný produkt na extrakciu DNA.

Používanie súpravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

UPOZORNENIE



Pozorne si prečítajte nasledujúce úpravy, ktoré je potrebné vykonať v protokole QIAamp.

- Informácie o príprave vzoriek pred deparafinizáciou a extrakciou DNA nájdete v časti „Východiskový materiál“ v *príručke k QIAamp DNA FFPE Tissue* a v časti Skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi na strane 17 v tejto príručke.
- Súprava QIAamp DNA FFPE Tissue Kit sa musí používať iba manuálne.
- Musí sa vykonať krok RNázy opísaný v *príručke k QIAamp DNA FFPE Tissue*.
- Nepoužívajte roztok QIAGEN Deparaffinization Solution. Na deparafinizáciu používajte iba metódu xylénu/etanolu podľa popisu v časti „Postup diaparafinizácie sklíčka pri použití súpravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“, nižšie. Xylén môže byť nahradený prípravkom Histolemon (náhrada xylénu).
- Digescia proteínázy K sa musí vykonávať počas 1 hodiny.
- Vzorky musia byť dvakrát eluované v 30 µl elučného pufru (Buffer ATE) zo súpravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Postup diaparafinizácie sklíčka pri použití súpravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

1. Umiestnite sklíčka do príslušného stojana na sklíčka.
2. Vložte stojan na sklíčka na 2 minúty do kúpeľa na sklíčka obsahujúceho xylén alebo Histolemon. Pretrepte 2 alebo 3 pohybmi dozadu a dopredu.
3. Na 2 minúty umiestnite stojan do druhého kúpeľa na sklíčka obsahujúceho etanol (96 – 100 %). Pretrepte 2 alebo 3 pohybmi dozadu a dopredu.
4. Sklíčka vysušte pri teplote 15 – 37 °C. Bude to trvať niekoľko minút.
5. Pre každú vzorku označte 1,5 ml mikrocentrifugačné skúmavky a do každej skúmavky pridajte 180 µl pufru Buffer ATL (zo súpravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit).
6. Nakvapajte niekoľko kvapiek pufru Buffer ATL na časti tkaniva na sklíčkach (tak, aby pokryli povrch tkaniva).
7. Oškrabte oblasť tkaniva sterilným skalpelom a oškrabané tkanivo pridajte do zodpovedajúcej označenej mikrocentrifugačnej skúmavky.
8. Do každej skúmavky pridajte 20 µl proteínázy K (zo súpravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) a premiešajte vortexovaním.
9. Inkubujte pri 56 °C po dobu 1 hodiny.

Pokračujte v inkubačnom kroku pri teplote 90 °C v protokole QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (krok 12 v *príručke k QIAamp DNA FFPE Tissue*, jún 2012, strana 13).

Používanie súpravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit

UPOZORNENIE



Pozorne si prečítajte nasledujúce úpravy, ktoré je potrebné uviesť do protokolového listu QIASymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.

- Informácie o príprave vzoriek pred deparafinizáciou a extrakciou DNA nájdete na v časti „Skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi“ na strane 17.
- Musí sa vykonať krok RNázy opísaný v protokolovom liste QIASymphony SP.
- Nepoužívajte roztok QIAGEN Deparaffinization Solution. Na deparafinizáciu používajte iba metódu xylénu/etanolu podľa popisu v časti Postup diaparafinizácie sklíčka pri použití súpravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit nižšie. Xylén môže byť nahradený prípravkom Histolemon (náhrada xylénu).
- Digescia proteínázy K sa musí vykonávať počas 1 hodiny.
- Elučný objem 50 µl sa musí vybrať na dotykovej obrazovke.

Postup diaparafinizácie sklíčka pri použití súpravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Vykonajte deparafinizáciu podľa nasledujúcich krokov, ktoré sa líšia od protokolu uvedeného v protokolovom liste QIASymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Umiestnite sklíčka do príslušného stojana na sklíčka.
2. Vložte stojan na sklíčka na 2 minúty do kúpeľa na sklíčka obsahujúceho xylén alebo Histolemon. Pretrepte 2 alebo 3 pohybmi dozadu a dopredu.
3. Na 2 minúty umiestnite stojan do druhého kúpeľa na sklíčka obsahujúceho etanol (96 – 100 %). Pretrepte 2 alebo 3 pohybmi dozadu a dopredu.
4. Sklíčka vysušte pri teplote 15 – 37 °C. Bude to trvať niekoľko minút.
5. Pre každú vzorku označte 1,5 ml mikrocentrifugačné skúmavky a do každej skúmavky pridajte 220 µl pufru Buffer ATL.

6. Nakvapkajte niekoľko kvapiek pufru Buffer ATL na časti tkaniva na sklíčkach (tak, aby pokryli povrch tkaniva).
7. Oškrabte oblasť tkaniva sterilným skalpelom a oškrabané tkanivo pridajte do zodpovedajúcej označenej mikrocetrifugačnej skúmavky.
8. Do každej skúmavky pridajte 20 µl proteínázy K (zo súpravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) a premiešajte vortexovaním.

Pokračujte krokom inkubácie pri teplote 56 °C v protokolovom liste QIASymphony SP: Protokol Tissue_LC_200_V7_DSP (krok 12 v protokole „Deparafinizácia pomocou xylénu“, apríl 2012). Inkubujte pri 56 °C po dobu 1 hodiny.

Genómová DNA

Genómovú DNA skladujte pri teplote 2 – 8 °C až 1 týždeň po extrakcii alebo 8 týždňov pri teplote –25 až –15 °C.

Množstvo DNA by sa malo určiť zmeraním optickej hustoty (optical density, OD) vzorky pri 260 nm.

Zriedte DNA na koncentráciu 5 ng/µl v 1x TE pufrí pri pH 8,0.

Reakcia PCR je optimalizovaná pre vzorky obsahujúce 25 ng purifikovanej genómovej DNA.

Protokol: Detekcia mutácií *IDH1/2*

Dôležité informácie pred začatím činnosti

- Na optimálne použitie súpravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit musia byť vzorky zoskupené do 4 dávok. Menšie dávky vzoriek spôsobia menší počet vzoriek na testovanie pomocou súpravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- Odporúčame testovať všetky vzorky raz za cyklus PCR, ako je uvedené v Tabuľke 2 a s rozložením vkladacieho bloku a nastavením rotora, ako je uvedené v Tabuľke 3 a na Obrázku 2.

Tabuľka 2. Počet reakcií pre prístroje Rotor-Gene Q MDx so 72-skúmavkovým rotorom

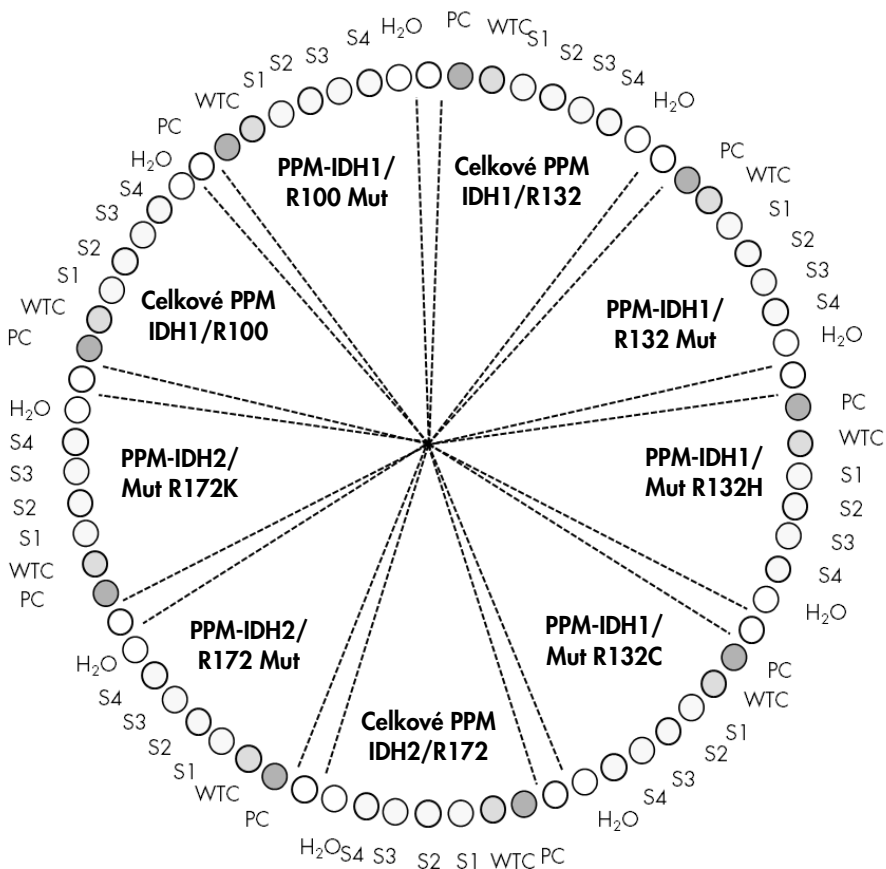
Vzorky	Reakcie
n vzoriek DNA	n x 1 reakcia
2 DNA kontroly	2 reakcie: Pozitívne kontroly a kontroly WT, každá z nich bola testovaná raz za cyklus PCR
Kontrola vody	1 reakcia

Tabuľka 3. Navrhovaný vkladací blok pre experiment so súpravou *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Vzorka	Celkové IDH1/R132	IDH1/ Mut R132H	IDH1 Mut R132H	IDH1 Mut R132H	Celkové/ DH2/R172	IDH2/ R172	Mut R172K	Celkové 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	
Prázdna skúmavka	8	16	24	32	40	48	56	64	72	

* PC: Pozitívna kontrola.

† WTC: Kontrola divého typu.



Obrázok 2. Navrhované nastavenie rotora pre experiment so súpravou *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Dôležité: Vzorku vždy umiestnite do polohy 1 rotora. Inak prístroj nevykoná kalibráciu a získajú sa nesprávne údaje o fluorescencii.

Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúce zmesi PCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Poznámka: Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 4 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25 µl. Pre každé PPM je možné pripraviť predbežnú zmes podľa počtu reakcií. Zahnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chýb pipetovania.

Tabuľka 4. Príprava zmesí PCR

Komponent	1 reakcia (µl)	Predbežná zmes: 7 + 1 reakcií (µl)	Konečná koncentrácia
Hlavná zmes qPCR, 2x	12,5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Voda bez nukleázy	6,5	52	–
Vzorka alebo kontrola† (má byť pridaná v kroku 4)	5	5 každá	–
Celkový objem	25	25 každá	–

* Pripravte 9 predbežných zmesí, jednu s každou z PPM dodaných v súprave.

† Pozitívna kontrola, negatívna kontrola alebo kontrola vody.

3. Do skúmavky Rotor-Gene nadávkujte 20 µl roztoku predbežnej zmesi (Tabuľka 3).
4. Pridajte 5 µl materiálu, ktorý sa má kvantifikovať (25 ng vzorky genómovej DNA alebo kontroly) do zodpovedajúcej skúmavky (celkový objem 25 µl; Tabuľka 3).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
6. Vložte skúmavky do adaptéra dodávaného s prístrojom (Obrázok 2).
Poznámka: Nevyužitú pozíciu je potrebné vyplniť prázdny skúmavkami.
7. Vložte plný adaptér do prístroja Rotor-Gene Q MDx.
8. Naprogramujte prístroj Rotor-Gene Q MDx a program tepelného cyklovača, ako je uvedené v Tabuľke 5.

Tabuľka 5. Teplotný profil

Hold (Výdrž)	Teplota: 95°C Čas: 10 min
Cycling (Cyklovanie)	40-krát 95 °C na 15 s 60 °C na 60 so získaním fluorescence FAM™ v kanáli Green: Jednotlivý

9. Kliknutím na **Gain Optimisation** (Získať optimalizáciu) v dialógovom okne New Run Wizard (Sprievodca novým cyklom) otvoríte dialógové okno Auto-Gain Optimisation Setup (Nastavenie automatickej optimalizácie zisku). Nastavte rozsah pre kanál Green **2FI** pre **Min Reading** (Min. hodnota) až **10FI** pre **Max Reading** (Max. hodnota).
10. Začiarknite políčko **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Vykonať optimalizáciu pred 1. akvizíciou) a zatvorte dialógové okno Auto-Gain Optimisation Setup (Nastavenie automatickej optimalizácie zisku).
11. Spustíte program tepelného cyklovača.
12. Po ukončení tepelného cyklovača vykonajte nasledovné.
 - 12a. Vyberte možnosť **Options > Crop Start Cycles** (Možnosti > Orezať začiatkové cykly). Pred cyklom **10** odstráňte údaje, aby sa vymazali všetky artefakty.
 - 12b. Vyberte **Analysis > Cycling A. Green from 10** (Analýza > Cycling A. Green od 10) uvedenú v správe „left threshold = 10.00“ (ľavá hranica = 10,00).
 - 12c. Vyberte **Dynamic Tube** (Dynamická skúmvavka) ako normalizačnú metódu a **Slope Correct** (Opraviť sklon) na opravu sklonu rušenia.
 - 12d. Nastavte možnosť **Outlier Removal** (Odstránenie extrémnych) na **0%** (zodpovedá prahovej hodnote NTC).
 - 12e. Zakážte možnosť **Reaction Efficiency Threshold** (Prahová hodnota účinnosti reakcie).
 - 12f. Definujte prahovú hodnotu na **0.03**.
 - 12g. Nastavte graf na lineárnu mierku.
 - 12h. Vyberte **Digital Filter** (Digitálny filter): **Light** (Svetlý).

Interpretácia výsledkov

Kontroly vody

Kontroly vody (bez kontroly šablón) by mali poskytovať nulové hodnoty C_T pre všetky zmesi primérov a sond.

Ak sa pri kontrole vody dosiahne pozitívna hodnota C_T , tak došlo ku krížovej kontaminácii. Riešenie nájdete v časti „Sprievodca riešením problémov“ na strane 36.

Kontrola kvality pomocou hodnôt kontrol C_T

Kontrola divého typu (wild-type control, WTC) *IDH1/2* a mutovaná pozitívna kontrola (Mut-PC, mutated positive control) *IDH1/2* umožňujú validáciu experimentu.

- Ak nie je k dispozícii žiadna hodnota C_t , kontrola sa klasifikuje ako mutačne negatívna pre príslušný detekčný test.
- Ak sú zistené hodnoty C_t , vypočítajte ΔC_T pre každú kontrolu nasledujúcim spôsobom

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

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

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

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

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

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

Kontroly sú klasifikované ako pozitívne na mutáciu, ak sú hodnoty ΔC_T menšie alebo rovnaké ako príslušné medzné hodnoty ΔC_T uvedené v Tabuľke 6. Ak je hodnota ΔC_T vyššia ako medzná hodnota, kontrola sa pre uvažovaný mutačný test klasifikuje ako mutačne negatívna.

Tabuľka 6. Medzné hodnoty pre jednotlivé mutačné testy

Mutačný test	Medzná 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* divého typu musí byť detegovaná ako mutačne negatívna pre každý mutačný test (Tabuľka 7).
- Mutačná pozitívna kontrola *IDH1/2* musí byť detegovaná ako mutačne pozitívna pre každý mutačný test (Tabuľka 7).

Celý experiment je odmietnutý, ak nie je splnená jedna alebo obe podmienky.

Tabuľka 7. Príklad validácie cyklu chodu na kontrolách

Hodnota	Voda (NTC)	Kontrola IDH1/IDH2 WT	Pozitívna kontrola IDH1/IDH2
C _T Celkové IDH1/R132	Nedetegované	25,45	23,95
C _T IDH1/R132 Mut	Nedetegované	34,32	25,76
ΔC _T IDH1/R132 Mut	Nedetegované	8,87	1,81
C _T Celkové IDH2/R172	Nedetegované	25,42	24,93
C _T IDH2/R172 Mut	Nedetegované	34,36	26,36
ΔC _T IDH2/R172 Mut	Nedetegované	8,94	1,43
C _T Celkové IDH1/R100	Nedetegované	26,30	24,69
C _T IDH1/R100 Mut	Nedetegované	33,04	26,39
ΔC _T IDH1/R100 Mut	Nedetegované	6,74	1,70
C _T IDH1 Mut R132H	Nedetegované	35,20	26,48
ΔC _T IDH1 Mut R132H	Nedetegované	9,75	2,53
C _T IDH1 Mut R132C	Nedetegované	37,16	27,07
ΔC _T IDH1 Mut R132C	Nedetegované	11,71	3,12
C _T IDH2 Mut R172K	Nedetegované	Nedetegované	27,97
ΔC _T IDH2 Mut R172K	Nedetegované	Nie je k dispozícii	3,04

Validácia vstupu vzorky

Pred interpretáciou sa musí validovať vstup vzorky.

Hodnota C_T získaná pre vzorku s každým celkovým PPM ($C_{T \text{ Celkové IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Celkové IDH2/R172}}$ a $C_{T \text{ Celkové IDH1/R100}}$) musí byť nižšia ako 32,00. Hodnoty $C_{T \text{ Celkové}} \geq 32,00$ sú spôsobené nedostatočnou kvalitou DNA. Vzorka sa musí znova otestovať. Ak je množstvo DNA stále nedostatočné, extrahujte viac nádorového tkaniva, ak je k dispozícii (pozri „Sprievodca riešením problémov“, strana 36).

Výsledky vzoriek

Detekcia mutácie *IDH1/2*

Pre každú vzorku vypočítajte hodnoty ΔC_T získané pri každom stanovení detekčnej mutácie (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut) nasledujúcim spôsobom.

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

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

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

Ak pre test detekcie mutácií neexistuje hodnota C_t , musí sa vzorka pre uvažovanú mutáciu klasifikovať ako mutačne negatívna.

Vzorky sú klasifikované ako pozitívne na mutáciu, ak je hodnota ΔC_T menšia alebo rovnaká ako medzná hodnota ΔC_T príslušného testu detekcie mutácií, uvedená v Tabuľke 8.

Tabuľka 8. Medzné hodnoty pre jednotlivé testy detekcie mutácií

Mutačný test	Medzná hodnota (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5,34
IDH2/R172 Mut	6,42
IDH1/R100 Mut	4,65

Identifikácia mutácie *IDH1/2*

Pre každú vzorku nasledujúcim spôsobom vypočítajte hodnoty ΔC_T získané pri každom teste identifikácie mutácie (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K).

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

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

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

Ak pre test identifikácie mutácie neexistuje hodnota C_T , musí sa vzorka klasifikovať ako mutačne negatívna.

Mutácia vzorky je identifikovaná, ak je hodnota ΔC_T menšia alebo rovnaká ako medzná hodnota ΔC_T príslušného testu identifikácie mutácií, uvedená v Tabuľke 9. Príklady interpretácie ΔC_T sú uvedené v Tabuľke 10 a Tabuľke 11.

Tabuľka 9. Medzné hodnoty pre jednotlivé testy identifikácie mutácií

Mutačný test	Medzná hodnota (ΔC_T)
IDH1 Mut R132H	6,87
IDH1 Mut R132C	7,14
IDH2 Mut R172K	8,49

Tabuľka 10. Príklad detekcia mutácie *IDH1/2*

Hodnota	Vzorka 1	Vzorka 2
C_T Celkové <i>IDH1/R132</i>	26,39	26,32
C_T <i>IDH1/R132 Mut</i>	33,86	28,29
ΔC_T <i>IDH1/R132 Mut</i>	7,47	1,97
C_T Celkové <i>IDH2/R172</i>	26,79	25,79
C_T <i>IDH2/R172 Mut</i>	35,13	35,21
ΔC_T <i>IDH2/R172 Mut</i>	8,34	9,42
C_T Celkové <i>IDH1/R100</i>	27,20	27,37
C_T <i>IDH1/R100 Mut</i>	33,83	33,76
ΔC_T <i>IDH1/R100 Mut</i>	6,63	6,39
Detekcia mutácie	Žiadna mutácia nezistená	Detegovaná mutácia R132

Tabuľka 11. Príklad identifikácie mutácie *IDH1/2*

Hodnota	Vzorka 1	Vzorka 2
C_T Celkové <i>IDH1/R132</i>	26,39	26,32
C_T <i>IDH1</i> Mut R132H	33,82	28,27
ΔC_T <i>IDH1</i> Mut R132H	7,43	1,95
C_T Celkové <i>IDH1/R132</i>	26,39	26,32
C_T <i>IDH1</i> Mut R132C	37,94	Nedetegované
ΔC_T <i>IDH1</i> Mut R132C	11,55	Nie je k dispozícii
C_T Celkové <i>IDH2/R172</i>	26,79	25,79
C_T <i>IDH2</i> Mut R172K	Nedetegované	Nedetegované
ΔC_T <i>IDH2</i> Mut R172K	Nie je k dispozícii	Nie je k dispozícii
Identifikácia mutácie	Žiadna mutácia nezistená	Zistila sa mutácia pre R132H

Interpretácia mutácií *IDH1/2*

Postup použitý na priradenie typu mutácie *IDH1/2* vzorkám pozitívnym na mutáciu *IDH1/2* je uvedený v Tabuľke 12. Príklad interpretácie je uvedený v Tabuľke 13.

Tabuľka 12. Sprievodca interpretáciou

		Identifikácia mutácie			Žiadna mutácia nezistená
		Detegované <i>IDH1</i> Mut R132H	Detegované <i>IDH1</i> Mut R132C	Detegované <i>IDH2</i> Mut R172K	
Detekcia mutácie	Detegovaná mutácia R132	Detegovaná mutácia R132H	Detegovaná mutácia R132C	–	Mutácia R132, ale nie R132H ani R132C
	Detegovaná mutácia R172	–	–	Detegovaná mutácia R172K	Mutácia R172 ale nie R172K
	Detegovaná mutácia R100	–	–	–	R100
	Žiadna mutácia nezistená	Zistený nízky obsah mutácie R132H (od 1 % do 2 %)*	Zistený nízky obsah mutácie R132C (od 1 % do 4 %)*	Zistený nízky obsah mutácie R172K (cca 1 %)*	Žiadna mutácia nezistená

* Tieto prípady sa môžu vyskytnúť zriedka a mali by sa skontrolovať všetky vzorky a kritériá technickej akceptácie, najmä obsah nádorových buniek. Ak sú splnené všetky kritériá, vzorka by sa mala znovu otestovať.

Tabuľka 13. Príklad hlásenia a interpretácie mutácií *IDH1/2*

	Vzorka 1	Vzorka 2
Detekcia mutácie	Žiadna mutácia nezistená	Detegovaná mutácia R132
Identifikácia mutácie	Žiadna mutácia nezistená	Zistila sa mutácia pre R132H
Interpretácia výsledkov	Nezistila sa ani sa neidentifikovala žiadna mutácia	R132H mutovaná

Poznámka: Ak má vzorka 2 alebo viac hodnôt ΔC_T menších alebo rovnakých ako medzné hodnoty ΔC_T , tak sa stav mutácie priradí mutácii s najväčším rozdielom medzi medznou a získanou hodnotou ΔC_T . Pozrite si príklad v Tabuľke 14.

Tabuľka 14. Príklad interpretácie v prípade viacerých pozitívnych výsledkov

	Vzorka 3	Vzorka 4
ΔC_T <i>IDH1/R132 Mut</i>	1,24	5,24
Medzná hodnota ΔC_T <i>IDH1/R132 Mut</i>	5,34	5,34
(Medzná hodnota $\Delta C_T - \Delta C_T$) <i>IDH1/R132 Mut</i>	4,10	0,10
ΔC_T <i>IDH2/R172 Mut</i>	5,32	5,95
Medzná hodnota ΔC_T <i>IDH2/R172 Mut</i>	6,42	6,42
(Medzná hodnota $\Delta C_T - \Delta C_T$) <i>IDH2/R172 Mut</i>	1,10	0,47
Interpretácia výsledkov	R132 mutovaná	R172 mutovaná

Sprievodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com.

Komentáre a návrhy

Upchatý stípec počas extrakcie DNA

Neúplná lýza

Opakujte odstredenie.

Zvyšný lyzát sa môže preniesť do nového stípca.

Opakujte extrakciu s menším množstvom tkaniva FFPE.

Nedostatok DNA v extrakčnom eluáte

Nedostatočná plocha tkaniva
FFPE

Opakujte postup extrakcie s ďalšou sekciou(-ami) tkaniva FFPE.

Nedetegovala sa kontrola IDH1/2 WT

a) Chyby pri pipetovaní alebo
vynechané reagenty;
preklopenie skúmavky alebo
jamky

Skontrolujte schému pipetovania a nastavenie reakcie.

Zopakujte cyklus PCR.

b) Nesprávne skladovanie
komponentov súpravy

Súpravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte pri teplote od
–30 do –15 °C a chráňte zmes primérov a sond pred svetlom. Pozri
„Skladovanie a manipulácia s reagentami“, strana 16.

Neprekračujte maximálne 5 cyklov zmrazenia a rozmrazenia.

c) Súprava *therascreen* IDH1/2
RGQ PCR Kit expirovala

Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri
štítko súpravy) reagentov a ak je to potrebné, použite novú súpravu
therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Komentáre a návrhy

Nedetegovala sa pozitívna kontrola *IDH1/2*

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Chyby pri pipetovaní alebo vynechané reagensy; preklopenie skúmavky alebo jamky | Skontrolujte schému pipetovania a nastavenie reakcie.

Zopakujte cyklus PCR. |
| b) | Nesprávne skladovanie komponentov súpravy | Súpravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte pri teplote od –30 do –15 °C a chráňte zmes primérov a sond pred svetlom. Pozri „Skladovanie a manipulácia s reagensmi“, strana 16.

Neprekračujte maximálne 5 cyklov zmrazenia a rozmrazenia. |
| c) | Súprava <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit expirovala | Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensy a ak je to potrebné, použite novú súpravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |

Žiadny signál vrátane signálu pre kontroly

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Žiadna reakčná skúmavka v polohe 1 prístroja Rotor-Gene Q MDx | Vzorku vždy umiestnite do polohy 1 rotora. Inak prístroj nevykoná kalibráciu a získajú sa nesprávne údaje o fluorescencii. |
| b) | Chyby pri pipetovaní alebo vynechané reagensy; preklopenie skúmavky alebo jamky | Skontrolujte schému pipetovania a nastavenie reakcie.

Zopakujte cyklus PCR. |
| c) | Nesprávne skladovanie komponentov súpravy | Súpravu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte pri teplote od –30 do –15 °C a chráňte zmes primérov a sond pred svetlom. Pozri „Skladovanie a manipulácia s reagensmi“, strana 16.

Neprekračujte maximálne 5 cyklov zmrazenia a rozmrazenia. |

Komentáre a návrhy

- d) Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit exspirovala
Škontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a ak je to potrebné, použite novú súpravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- e) Bol zvolený nesprávny detekčný kanál
Nastavte detekčný kanál na Cycling Green alebo 530 nm/640 nm.
- f) Žiadny program akvizície údajov
Škontrolujte program cyklov. Pozri Tabuľku 5, strana 26.
Vyberte režim akvizície **Single** (Samostatná) na konci každého segmentu hybridizácie primérov programu PCR.

Intenzita fluorescence sa líši

Chyby pri pipetovaní alebo vynechané reagensie; preklopenie skúmavky alebo jamky

Škontrolujte schému pipetovania a nastavenie reakcie.
Zopakujte cyklus PCR.

Intenzita fluorescence je príliš nízka

- a) Nesprávne skladovanie komponentov súpravy
Súpravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit skladujte pri teplote od –30 do –15 °C a chráňte zmes primérov a sond pred svetlom. Pozri „Skladovanie a manipulácia s reagensiami“, strana 16.
Neprekračujte maximálne 5 cyklov zmrazenia a rozmrazenia.
- b) Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit exspirovala
Škontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a ak je to potrebné, použite novú súpravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- c) Veľmi malé množstvo cieľovej DNA
Pred začiatkom vždy škontrolujte koncentráciu DNA. Pozri „Extrakcia a príprava DNA“, strana 18.

Komentáre a návrhy

Negatívna kontrola (H₂O) poskytuje pozitívny výsledok

Krížová kontaminácia,
kontaminácia reagentie, chyba
prístroja, obrátenie jamiek alebo
kapilár alebo degradácia sondy

Vymeňte všetky kritické reagentie alebo použite novú súpravu
therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit.

So vzorkami, komponentmi súpravy a spotrebným materiálom vždy
zaobchádzajte v súlade so všeobecne uznávanými postupmi, aby
ste zabránili kontaminácii pri prenose.

Zmesi primérov a sond chráňte pred svetlom.

Skontrolujte, či na fluorescenčných krivkách nie sú falošné
pozitívne výsledky.

Skontrolujte nastavenie reakcie. Pozri „Protokol: Detekcia mutácií
IDH1/2“, strana 22.

Kontrola kvality

V súlade so certifikovaným systémom riadenia kvality QIAGEN ISO je každá šarža súpravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit testovaná na základe vopred určených špecifikácií, aby bola zaistená konzistentná kvalita produktu. Osvedčenia o analýze sú k dispozícii na požiadanie na stránke www.qiagen.com/support/.

Obmedzenia

Súprava je určená na profesionálne použitie.

Výrobok smú používať iba pracovníci špeciálne poučení a vyškolení v technikách molekulárnej biológie, ktorí sú oboznámení s touto technológiou.

Táto súprava by sa mala používať podľa pokynov uvedených v tejto príručke v kombinácii s overeným prístrojom uvedeným v „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“, strana 12.

Pozornosť by sa mala venovať dátumom expirácie vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované komponenty.

Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit bola overená iba pre puľované mozgové tkanivo fixované formaldehydom a zaliate do parafínu.

Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit bola overená iba na použitie so súpravou QIAamp DNA FFPE Tissue Kit alebo QIAasymphony DSP DNA Mini Kit.

Boli overené iba prístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (pre PCR) a QIAasymphony SP (na prípravu vzorky).

Používanie tohto produktu spôsobom, ktorý nie je v súlade s príručkou, a/alebo modifikácia komponentov ruší zodpovednosť spoločnosti QIAGEN

Používateľ je zodpovedný za overenie výkonu systému pre všetky postupy používané v jeho laboratóriu, na ktoré sa nevzťahujú štúdie výkonnosti QIAGEN.

Test je určený na detekciu 7 mutácií v kodónoch 132 a 100 génu *IDH1* a 5 mutácií v kodóne 172 génu *IDH2*. Vzorky s výsledkami označenými ako „no mutation detected“ (nebola zistená žiadna mutácia) môžu obsahovať mutácie *IDH1* alebo *IDH2*, ktoré neboli detegované testom.

Detekcia mutácií závisí od integrity vzorky, obsahu nádoru a amplifikovateľnej DNA prítomnej vo vzorke.

Všetky diagnostické výsledky generované pomocou produktu sa musia interpretovať v kontexte všetkých relevantných klinických alebo laboratórnych nálezov.

Charakteristiky účinnosti

Limit slepého pokusu (Limit of blank, LOB)

Limit slepého pokusu (Limit of blank, LOB) bol stanovený (podľa pokynov CLSI/NCCLS EP17-A; 14) na negatívnych vzorkách (normálne mozgové FFPE, 8 vzoriek, 64 meraní/šarža, 2 šarže).

Výsledky LOB sú uvedené v Tabuľke 15.

Tabuľka 15. Limit slepého pokusu (Limit of blank, LOB)

Test	LOB	Konečný LOB
R132 Mut	Validačná šarža 1: 6,57 Validačná šarža 2: 6,32	6,32
R132H Mut	Validačná šarža 1: 7,91 Validačná šarža 2: 8,22	7,91
R132C Mut	Validačná šarža 1: 8,04 Validačná šarža 2: 8,20	8,04
R172 Mut	Validačná šarža 1: 7,74 Validačná šarža 2: 7,59	7,59
R172K Mut	Validačná šarža 1: 9,93 Validačná šarža 2: 10,58	9,93
R100 Mut	Validačná šarža 1: 6,52 Validačná šarža 2: 5,19	5,17

Limit detekcie (Limit of detection, LOD)

Limit detekcie (LOD alebo analytická citlivosť) bol stanovený na základe „prístupu presného profilu“ opísaného v pokynoch CLSI/NCCLS EP17-A (14). Na jednu mutáciu sa použilo päť nízko pozitívnych vzoriek (plazmidová DNA obohatená o glióm divého typu DNA) (30 až 110 meraní na typ mutácie a percento mutácie).

Výsledky LOD sú uvedené v Tabuľke 16.

Tabuľka 16. Limit detekcie (Limit of detection, LOD)

Test	Mutácie	LOD	Medzná hodnota testu	Citlivosť (%)
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

Mutácia sa deteguje, ak je hodnota ΔC_T menšia alebo rovnaká ako LOD.

Účinok vstupu DNA

DNA bola extrahovaná zo 4 rôznych vzoriek nádoru s gliómom: 2 s *IDH1/2* divého typu a 2 nesúce mutáciu *IDH1* R132H (395G>A).

Testovali sa tri rôzne množstvá DNA (vrátane množstva odporúčaného pre protokol), aby sa vyhodnotil vplyv vstupu DNA na kvalitatívne výsledky. Výsledky preukázali, že vstup DNA nemal žiadny vplyv na kvalitatívne výsledky. Pozorovalo sa však viacero technických porúch (zlyhania kontroly kvality C_T Celkové) pre vstup DNA nižší ako odporúčaný vstup (< 25 ng DNA). Z tohto dôvodu sa na vykonanie testu odporúča vstup 25 ng DNA v objeme 5 μ l.

Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť

Štúdia presnosti sa vykonala na 4 rôznych vzorkách (plazmidová DNA obohatená o glióm divokého typu DNA reprezentatívnu pre divý typ (wild-type, WT), mutantnú a medznú vzorku) testovaných duplicitne 40-krát ($n = 80$ meraní).

Štandardné odchýlky (Standard deviations, SD) a koeficienty variácie (coefficients of variation, CV) sú uvedené v Tabuľke 17.

Tabuľka 17. Presnosť výsledkov

Test	Vzorka	Stredná hodnota ΔC_T	SD_R^*	SD_{Cyklus}^\dagger	$SD_{Celkové}^\ddagger$	$CV_{Celkové}(\%)^\ddagger$	Miera správnych volaní
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 (Opakovateľnosť).

† Cyklus: Reprodukovateľnosť medzi cyklami.

‡ Celkom: Celková presnosť (vrátane presností medzi prístrojmi, operátormi a šaržami).

Tabuľka pokračuje na nasledujúcej strane

Tabuľka 17. Presnosť výsledkov (pokračovanie)

Test	Vzorka	Stredná hodnota ΔC_T	SD_R^*	$SD_{\text{Cyklus}}^\dagger$	$SD_{\text{Celkové}}^\ddagger$	$CV_{\text{Celkové}}(\%)^\ddagger$	Miera správnych volaní
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 (Opakovateľnosť).

† Cyklus: Reprodukovateľnosť medzi cyklami.

‡ Celkom: Celková presnosť (vrátane presnosti medzi prístrojmi, operátormi a šaržami).

Porovnanie metód

Porovnanie s imunohistochémiou (immunohistochemistry, IHC) na detekciu *IDH1/R132H*.

Uskutočnila sa štúdia na preukázanie zhody medzi mutačným stavom hodnoteným pomocou súpravy *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* a pomocou IHC (klon protilátky proti ľudskému *IDH1R132H H09*, DIANOVA).

Celkom bolo vybraných 103 vzoriek klinických gliómov. Najstarší blok mal 10 rokov.

Všetky vzorky prešli kontrolou kvality tak pre súpravu *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* ako aj pre IHC.

Výsledky preukázali pozitívnu percentuálnu zhodu (positive percentage agreement, PPA) 100 %, negatívnu percentuálnu zhodu (negative percent agreement, NPA) 98 % a celkovú zhodu (overall agreement, OA) 99 % (Tabuľka 18).

Tabuľka 18. Analýza zhody medzi súpravou *therascreen* RGQ PCR Kit a IHC

Miera zhody	Frekvencia (%)	95 % interval spoľahlivosti
PPA	45/45 (100 %)	[92;100]
NPA	57/58 (98 %)	[91;100]
OA	102/103 (99 %)	[96;100]

Porovnanie s obojsmerným sekvenovaním

Uskutočnila sa štúdia na preukázanie zhody medzi mutačným stavom hodnoteným pomocou súpravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit a pomocou obojsmerného sekvenovania.

Bolo vybraných celkovo 103 klinických vzoriek nádorov od pacientov s gliómom. Najstarší blok mal 10 rokov.

Všetkých 103 vzoriek prešlo kontrolami kvality súpravy *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit a 101 vzoriek vrátilo výsledky pre obojsmerné sekvenovanie.

Výsledky preukázali pozitívnu percentuálnu zhodu (positive percentage agreement, PPA) 100 %, negatívnu percentuálnu zhodu (negative percent agreement, NPA) 92 % a celkovú zhodu (overall agreement, OA) 96 % (Tabuľky 19 a 20).

Tabuľka 19. Súprava *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit vs. obojsmerné sekvenovanie

		Obojsmerné sekvenovanie Sanger				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT
Súprava <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 znamená, že vzorka zmutovala na mutáciu R132, ale nie na R132H ani R132C.

† R172 znamená, že vzorka zmutovala na mutáciu R172, ale nie na R172K.

Tabuľka 20. Analýza zhody s obojsmerným sekvenovaním

Miera zhody	Frekvencia (%)	95 % interval spoľahlivosti
PPA	50/50 (100 %)	[93;100]
NPA	47/51 (92 %)	[81;97]
OA	97/101 (96 %)	[90;98]

Referenčná literatúra

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

Nasledujúca tabuľka popisuje symboly, ktoré sa môžu objaviť na štítku alebo v tomto dokumente.



<N>

Obsahuje reagentie postačujúce na <N> reakcií



Použite do



Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro



Katalógové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu (t.j. označenie komponentu)



Komponenty (t.j. zoznam zahrnutých)



Obsahuje (obsah)



Počet (t.j. liekovky, fľaše)

Rn

R označuje revíziu príručky a n je číslo revízie



Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)



Teplotné obmedzenia



Výrobca



Prečítajte si návod na použitie



Upozornenie

Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	Pre 20 reakcií: 9 zmesí primérov a sond, kontrola WT, pozitívna kontrola, hlavná zmes, voda bez nukleáz	873011
Rotor-Gene Q MDx a príslušenstvo		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Hliníkový blok na manuálne nastavenie reakcie s jednokanálovou pipetou v skúmavkách s objemom 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 prúžkov so 4 skúmavkami a viečkami na 1000 reakcií	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 prúžkov so 4 skúmavkami a viečkami na 10 000 reakcií	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – na purifikáciu genómovej DNA z tkanív zaliatych parafínom		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pre 50 príprav DNA: 50 stĺpcov QIAamp MinElute®, proteínáza K, pufré, odberové skúmavky (2 ml)	56404
Súprava QIAasymphony DSP DNA Mini Kit – na automatizovanú purifikáciu DNA z 1 – 96 vzoriek		
QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Pre 192 príprav po 200 µl: obsahuje 2 reagenčné kazety, stojany na enzýmy a príslušenstvo	937236

Produkt	Obsah	Kat. č.
QIASymphony SP a príslušenstvo		
QIASymphony SP System	Modul na prípravu vzorky QIASymphony: zahŕňa inštaláciu a zaškolenie a 1-ročnú záruku na diely a prácu	9001751
QIASymphony SP	Modul na prípravu vzorky QIASymphony: zahŕňa 1-ročnú záruku na diely a prácu	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-jamkové kazety na prípravu vzoriek na použitie s QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers na použitie s QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Disposable Filter-Tips, v stojane; (8 x 128). Na použitie s prístrojmi QIACube a QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Disposable Filter-Tips, v stojane; (8 x 128). Na použitie s prístrojmi QIASymphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Nesterilné polypropylénové skúmavky (maximálna kapacita 0,85 ml, skladovacia kapacita menej ako 0,7 ml, elučná kapacita 0,4 ml); 2304 v regáloch po 96; obsahuje viečkové pružky	19588
Reagencie		
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 jednotiek/ml, roztok)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml tkanivový lyzačný pufer na 1000 príprav	19076

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite www.qiagen.com alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

História úprav dokumentu

Dátum	Zmeny
R5, júl 2020	Revidovaná časť Interpretácia výsledkov s cieľom pridať informácie týkajúce sa klasifikácie kontrol a vzoriek v závislosti od detekcie hodnoty C_T Revidovaný stĺpec kontroly IDH1/IDH2 WT v Tabuľke 7 pre C_T IDH Mut R172K a ΔC_T IDH2 Mut R172K Revidované stĺpce vzorky 1 a vzorky 2 v Tabuľke 11 pre C_T IDH1 Mut R132C, ΔC_T IDH1 Mut R132C, C_T IDH2 Mut R172K, a ΔC_T IDH2 Mut R172K

Táto strana je zámerne prázdna

Obmedzená licenčná zmluva pre súpravu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa tohto produktu s nasledovnými podmienkami:

1. Produkt sa môže používať výlučne v súlade s protokolmi poskytovanými spolu s produktom a touto príručkou, a môže sa používať výlučne s komponentmi obsiahnutými v súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeluje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy s akýmkkoľvek komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy s výnimkou ustanovení uvádzaných v protokoloch dodávaných spolu s produktom, tejto príručke a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese www.qiagen.com. Niektoré z týchto protokolov boli poskytnuté používateľmi produktov od spoločnosti QIAGEN pre používateľov produktov od spoločnosti QIAGEN. Tieto protokoly neboli podrobne testované ani optimalizované spoločnosťou QIAGEN. Spoločnosť QIAGEN na ne neposkytuje žiadne záruky a neručí za to, že ich použitím nedôjde k porušeniu práv tretích strán.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolia vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese www.qiagen.com.

Tento produkt je určený na diagnostické použitie *in vitro*. Produkty QIAGEN sa nemôžu opätovne predávať, upravovať na ďalší predaj ani používať na výrobu komerčných výrobkov bez písomného súhlasu spoločnosti QIAGEN.

Informácie uvádzané v tomto dokumente sa môžu zmeniť bez predchádzajúceho upozornenia. Spoločnosť QIAGEN nenesie žiadnu zodpovednosť za chyby, ktoré sa môžu vyskytnúť v tomto dokumente. Tento dokument sa v čase uverejnenia považuje za úplný a presný. Spoločnosť QIAGEN v žiadnom prípade nezodpovedá za náhodné, špeciálne, viacsobné alebo následné škody, ktoré vzniknú v súvislosti s používaním tohto dokumentu alebo vyplývajúce z jeho použitia.

Na produkty QIAGEN sa poskytuje záruka, že spĺňajú uvedené špecifikácie. Jediný záväzok spoločnosti QIAGEN a jediný prostriedok nápravy zákazníkom je obmedzený na bezplatnú výmenu produktov v prípade, že produkty nebudú fungovať v súlade so zárukou.

Zakúpenie tohto produktu umožňuje kupujúcemu použiť ho na vykonávanie diagnostických služieb pre ľudskú diagnostiku *in vitro*. Tým sa neudeluje žiadny všeobecný patent ani iná licencia iného druhu ako toto konkrétne právo na používanie vyplývajúce z nákupu.

Mutácie *IDH1/2* a jej použitia sú chránené patentovými právami vrátane európskych patentových prihlášok EP2326735 a EP2546365, amerických patentových prihlášok US2011229479 a US2012202207 a zahraničných náprotivkov.

Nákup tohto produktu neposkytuje žiadne právo na jeho použitie na klinické skúšky liekov zameraných na *IDH1/2*. QIAGEN vyvíja špecifické licenčné programy pre takéto použitie. Kontaktujte naše právne oddelenie na idllicenses@qiagen.com.

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

1119896 07-2020 HB-1566-005 © 2020 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

