

Juli 2020

Håndbok for *therascreen*[®] IDH1/2 RGQ_w PCR Kit



Versjon 1

For påvisning av 12 *IDH1*- og *IDH2*-mutasjoner i gliomer

IVD

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Til bruk sammen med Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex
HRM-instrument



REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R5 **MAT**

1119896NO

Innhold

Tiltent bruk	5
Sammendrag og forklaring	6
Prosedyreprinsipp	8
Materialer som medfølger	10
Settets innhold	10
Materialer som er nødvendige, men ikke følger med	12
Advarsler og forholdsregler	14
Sikkerhetsinformasjon	14
Generelle forholdsregler	14
Oppbevaring og håndtering av reagenser	16
Forsendelsesbetingelser	16
Oppbevaring	16
Stabilitet	16
Håndtering og oppbevaring av prøver	17
Prosedyre	18
DNA-ekstraksjon og klargjøring	18
Protokoll: Påvisning av <i>IDH1/2</i> -mutasjoner	22
Tolkning av resultater	27
Vannkontroller	27
Kvalitetskontroll ved hjelp av C_T -verdier for kontroller	27
Validering av prøveinput	30
Prøveresultater	30

Feilsøkningsveiledning	36
Kvalitetskontroll	39
Begrensninger	40
Ytelsesegenskaper	42
Grense for blank prøve (LOB)	42
Deteksjonsgrense (Limit of Detection, LOD)	42
Effekten av DNA-input.....	44
Repeterbarhet og reproduserbarhet	44
Metodesammenligning	47
Referanser	50
Symboler	52
Bestillingsinformasjon	54
Endringshistorikk for dokument	57

Tiltenkt bruk

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit er en in vitro-diagnostisk test basert på PCR-teknologi, som er beregnet på kvalitativ påvisning av 7 mutasjoner av *IDH1*-genet og 5 mutasjoner av *IDH2*-genet samt for direkte identifisering av 3 hovedmutasjoner i DNA ekstrahert fra formalinfiksert, parafininnstøpt (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) humant hjernevev.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit er beregnet for bruk som et hjelpemiddel i klassifisering av gliomer.

Sammendrag og forklaring

Mutasjoner i isocitratdehydrogenase-genene (IDH-gener), *IDH1* og *IDH2*, er hyppige hos voksne i gliomer klassifisert som grad II og III av Verdens helseorganisasjon (World Health Organization, WHO) og sekundære glioblastomer (GBM) klassifisert av WHO som grad IV. I tillegg til den diagnostiske verdien assosieres tilstedeværelsen av *IDH1/2*-mutasjoner med positiv prognose for gliompatienter (1–13).

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit er en analyse for påvisning av 12 spesifikke *IDH1/2*-mutasjoner: 6 innenfor kodon 132 på *IDH1*-genet, 5 innenfor det homologe kodonet 172 på *IDH2* og 1 innenfor kodon 100 på *IDH1* (tabell 1). Ved hjelp av settet kan man også foreta en direkte identifisering av *IDH1*- og *IDH2*-mutasjoner som fører til *IDH1* R132H-, *IDH1* R132C- og *IDH2* R172K-substitusjoner.

Tabell 1. IDH1- og IDH2-mutasjoner påvist ved hjelp av *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

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

* COSMIC ID-er er hentet fra Catalog of Somatic Mutations in Cancer (katalog over somatiske mutasjoner ved kreft) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Prosedyreprinsipp

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit kommer med reagenser til utførelse av 9 separate amplifikasjonsreaksjoner for påvisning av 12 mutasjoner (tabell 1):

- 3 totale amplifikasjonsreaksjoner av kodon 132 og 100 på *IDH1*-genet og av kodon 172 på *IDH2*-genet
- 3 mutasjonsamplifikasjonsreaksjoner av kodon 132 og 100 på *IDH1*-genet og av kodon 172 på *IDH2*-genet
- 3 mutasjonsspesifikke amplifikasjonsreaksjoner av mutasjonene *IDH1* R132H, *IDH1* R132C og *IDH2* R172K

Totalreaksjonsblandinger

I totale primer- og probeblandinger (PPM-total) brukes primere og prober til å amplifisere både mutant- og villtypemålsekvenser (figur 1).

Reaksjonsblandinger for mutasjonspåvisning

Primer- og probeblandingene for mutasjonspåvisning inneholder kombinasjoner av primere og prober for amplifikasjon av både mutant- og villtypemålsekvenser samt et oligonukleotid (3'-blokkert og med en fosfatgruppe for å forhindre forlengelse (PCR-blokkering)) som er spesifikt for villtypemålsekvensen.

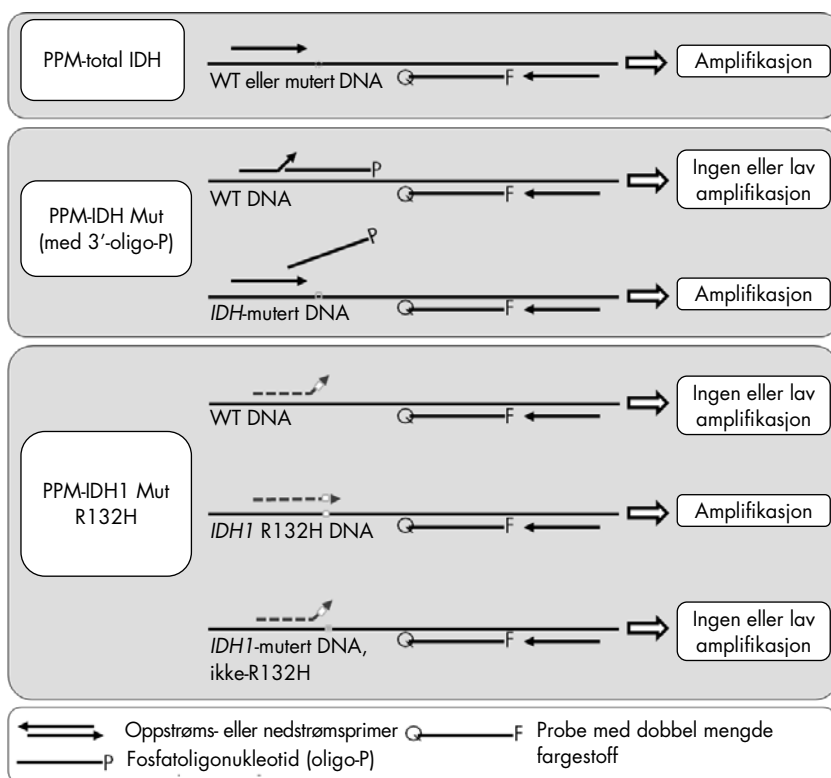
Når PCR-templatet inneholder villtypesekvensen, dominerer 3'-fosfatoligonukleotidet over PCR-primerbindingen grunnet høyere affinitet. Det forekommer ingen eller lav forlengelse av DNA-polymerasen og ingen eller lav amplifikasjon observeres.

Når en mutert sekvens er til stede, dominerer PCR-primerbindingen over 3'-fosfatoligonukleotidbindingen, og amplifikasjon finner sted (figur 1).

Reaksjonsblandinger for mutasjonsidentifisering

Allelspesifikk amplifikasjon oppnås ved hjelp av ARMS (Amplification Refractory Mutation System), som utnytter DNA-polymerasens evne til å skille mellom en match og en ikke-match ved 3'-enden av en PCR-primer.

Når PCR-primeren har full match, utføres amplifikasjonen med full effektivitet. Når 3'-basen ikke matcher, oppstår kun et lavt nivå av bakgrunnsamplifikasjon (figur 1).



Figur 1. Resultater oppnådd med primere og probelblandinger *itherascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit. Det samme prinsippet som ble vist for påvisning av *IDH1* R132H, gjelder for *IDH1* R132C og *IDH2* R172K.

Materialer som medfølger

Settets innhold

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalognummer		873011
Antall reaksjoner		20
Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> (Wild Type and Mutated) (Primer- og probeblanding for påvisning av total mengde <i>IDH1/R132</i> (villype og mutert))	PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Wild Type and Mutated) (Primer- og probeblanding for påvisning av total mengde <i>IDH2/R172</i> (villype og mutert))	PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Wild Type and Mutated) (Primer- og probeblanding for påvisning av total mengde <i>IDH1/R100</i> (villype og mutert))	PPM-Total <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R132</i> (Primer- og probeblanding (inkludert oligo-P) for påvisning av mutert <i>IDH1/R132</i>)	PPM- <i>IDH1/R132</i> Mut 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH2/R172</i> (Primer- og probeblanding (inkludert oligo-P) for påvisning av mutert <i>IDH1/R132</i>)	PPM- <i>IDH2/R172</i> Mut 25x	40 µl
Primers and Probe mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R100</i> (Primer- og probeblanding (inkludert oligo-P) for påvisning av mutert <i>IDH1/R100</i>)	PPM- <i>IDH1/R100</i> Mut 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132H (Primer- og probeblanding for identifisering av <i>IDH1</i> Mut R132H)	PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x	40 µl

Tabellen fortsetter på neste side.

Settets innhold (forts.)

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalognummer		873011
Antall reaksjoner		20
Primers and Probe Mix for the identification of IDH1 Mut R132C (Primer- og probeblanding for identifisering av IDH1 Mut R132C)	PPM-IDH1 Mut R132C 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of IDH2 Mut R172K (Primer- og probeblanding for identifisering av IDH2 Mut R172K)	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
IDH1/IDH2 Wild Type Genomic DNA (Genomisk villtype-IDH1/IDH2-DNA)	IDH1/IDH2 WT-kontroll	270 µl
IDH1/IDH2 Mutated Positive Control (IDH1/IDH2-mutert positiv kontroll)	IDH1/IDH2-positiv kontroll	270 µl
Mix of Taq DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR (Blanding av Taq DNA-polymerase, dNTPs, MgCl ₂ og buffer for qPCR)	qPCR forhåndsblending 2x	5 × 900 µl
Nuclease-Free Water (Nukleasefritt vann)	Nukleasefritt vann	5 × 525 µl
therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit Handbook (engelsk)		1

Materialer som er nødvendige, men ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

Viktig: Påse at instrumenter som brukes i denne prosedyren er blitt kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

Reagenser (manuell DNA-ekstraksjon)

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

Reagenser (automatisert DNA-ekstraksjon)

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

Forbruksartikler

- Skalpeller
- Nukleasefrie, aerosol-resistente og sterile PCR-pipettespisser med vannavstøtende filtre
- 2,0 ml eller 1,5 ml nukleasefrie rør

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

Ekstra forbruksartikler for automatisert DNA-ekstraksjon

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

Utstyr

- Objektglasstativ og 2 kompatible objektglassbad for xylen/histolemon og etanol
- Mikroliterpipetter dedikert til PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Bordsentrifuge med rotor for 0,5 ml/1,5 ml reaksjonsglass og mikroplater (kan oppnå 13 000–14 000 rpm)
- Bordvorteksmikser
- PCR-instrument i sanntid: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM og tilhørende spesifikt materiale
- Rotor-Gene Q MDx-programvaren, versjon 2.1.0 eller nyere
- Biofotometer
- Termomikser, oppvarmet orbital inkubator, varmeblokk eller vannbad egnet til inkubering ved 56 °C og 90 °C

Ekstra utstyr for automatisert rensing

- QIASymphony SP-instrument
- QIASymphony SP-programvareversjon 4.0 eller nyere

Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige på nett i PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan finne, vise og skrive ut sikkerhetsdatablader for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Hvis du ønsker sikkerhetsinformasjon for rensingssettet som brukes, kan du se relevant setthåndbok. Hvis du ønsker sikkerhetsinformasjon om instrumenter, kan du se brukerhåndboken for det aktuelle instrumentet.

Generelle forholdsregler

- Testen er beregnet for bruk med bufrede, formalinfikserte, parafininnstøpte (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) vevsprøver innhentet ved kirurgisk reseksjon.
- Alle kjemikalier og biologiske materialer er potensielt farlige. Prøver kan være smittefarlige og må behandles som smittefarlig biologisk materiale.
- Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.
- Reagensene for *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit er optimalt fortynnet. Ikke fortynn reagensene mer, ettersom det kan føre til tap av ytelse. Bruk ikke reaksjonsvolumer (reaksjonsmiks pluss prøve) som er mindre enn 25 µl.
- Alle reagensene som kommer med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit er utelukkende beregnet for bruk sammen med de andre reagensene i det samme settet. Ikke bytt noen reagenser mellom *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR-settene da dette kan påvirke ytelsen.

-
- Se bruksanvisningen for Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.
 - Endringer i inkubasjon og temperaturer kan føre til feilaktige eller diskordante data.
 - Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.
 - Primer- og probeblandinger kan forandres hvis de utsettes for lys.
 - Det er svært viktig å forhindre at blandingene kontamineres med de syntetiske materialene i den positive kontrollreagensen.
 - Det er svært viktig å forhindre kontaminering med DNase, som kan forårsake degradering av templat-DNA.
 - Bruk individuelle, tilegnede pipetter til klargjøring av reaksjonsblandinger og tilsetning av templater.
 - Klargjør og pipetter reaksjonsblandinger i et område som er atskilt fra området som brukes til å tilsette templatene.
 - Ikke åpne Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet før kjøringen er ferdig.
 - Ikke åpne Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-rør etter at kjøringen er ferdig.
 - Det er viktig at prøvetesting utføres riktig og at man unngår feil ved innsetting av prøve, innlasting og pipettering.

Oppbevaring og håndtering av reagenser

Forsendelsesbetingelser

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit sendes på tørris. Hvis en komponent i *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ikke er frosset ved ankomst, hvis ytteremballasjen har blitt åpnet under frakt, eller hvis forsendelsen ikke inneholder en pakkseddel, brukerhåndbok eller reagenser, må du kontakte en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller en lokal distributør (se www.qiagen.com).

Oppbevaring

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit skal umiddelbart etter mottak plasseres i en mørk fryser som holder en konstant temperatur på mellom $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Stabilitet

Når *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit oppbevares under de spesifiserte oppbevaringsforholdene, er settet stabilt frem til angitt utløpsdato.

Når reagenser først er åpnet, kan de oppbevares i originalemballasjen ved -30 til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ frem til utløpsdatoen på emballasjen. Gjentatt tining og frysing bør unngås. Maks 5 frysetine-sykluser kan benyttes.

Håndtering og oppbevaring av prøver

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kiter beregnet for bruk på DNA-prøver som er ekstrahert fra formalinfiksert, parafininnstøpt (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) tumorvev fra kirurgiske reseksjoner innhentet fra personer med hjernekreft. Alle vevsprøver skal behandles som potensielt smittefarlig materiale.

- Vevsprøver må fikseres i 4–10 % nøytralbufret formalin (NBF).
- 10 µm seriesnitt må skjæres fra parafinblokken og plasseres på objektglass.
- En opplært person (for eksempel en patolog) bør vurdere tumorinnhold og -område på en tilstøtende seksjon farget med hematoksylin og eosin (H&E). Bruk seriesnitt til DNA ekstraksjon.
- Kun seksjoner med ≥ 40 % tumorinnhold er kvalifisert for testen.
- For deler som inneholder < 50 mm² vevsområde, anbefaler vi å behandle et tilstrekkelig antall snitt, slik at det totale vevsområdet øker til minst 50 mm² (100 mm² for automatisert ekstraksjon på QIASymphony SP).
- Merk, håndter og oppbevar tumorprøver, blokker, objektglass og prøver som er klare for ekstraksjon på en kontrollert måte i henhold til lokale prosedyrer.
- Oppbevar FFPE-blokker og objektglass ved romtemperatur. Objektglass kan lagres ved romtemperatur i opptil 4 uker før DNA-ekstraksjon for bruk med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- Etter ekstraksjon kan genomisk DNA lagres i opptil 1 uke ved 2–8 °C eller 8 uker ved –25 °C til –15 °C.

Prosedyre

DNA-ekstraksjon og klargjøring

Bruk QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr. 56404) eller QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236) til å rense genomisk DNA fra prøver som er klargjort fra FFPE-hjernekreftprøver.

Merk: *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit har bare blitt godkjent i kombinasjon med QIAamp DNA FFPE Tissue Kit eller QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Bruk ikke noe annet DNA-ekstraksjonsprodukt.

Bruke QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

FORSIKTIG



Les nøye gjennom følgende modifikasjoner som må brukes på QIAamp-protokollen.

- Se "Startmaterialer" i *Håndboken for QIAamp DNA FFPE-vevssettet* og "Håndtering og oppbevaring av prøver" på side 17 i denne håndboken for klargjøring av prøver før parafinjerning og DNA-ekstraksjon.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit må kun brukes manuelt.
- RNase-trinnet som beskrives i *Håndboken for QIAamp DNA FFPE-vevssettet* må utføres.
- QIAGEN Deparaffinization Solution skal ikke brukes. Bruk kun xylene/etanol-metoden for parafinjerning som beskrevet i "Prosedyre for objektglassparafinjerning ved bruk av QIAamp DNA FFPE Tissue Kit", nedenfor. Xylen kan byttes ut med Histolemon (xylensubstitutt).
- Proteinase K-nedbrytning må foregå i 1 time.
- Prøvene må elueres to ganger i 30 µl elueringsbuffer (Buffer ATE) fra QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Prosedyre for objektglassparafinfjerning ved bruk av QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

1. Plasser objektglassene i et spesifikt objektglasstativ.
2. Sett objektglasstativet oppi et objektglassbad som inneholder xylen eller histolemon, og la det stå i 2 minutter. Rist med 2 eller 3 bevegelser bakover og forover.
3. Plasser objektglasstativet oppi et objektglassbad nummer to som inneholder etanol (96–100 %), og la det stå i 2 minutter. Rist med 2 eller 3 bevegelser bakover og forover.
4. La objektglassene tørke ved 15–37 °C. Dette vil ta noen minutter.
5. Merk 1,5 ml mikrosentrifugerør for hver prøve, og tilsett 180 µl Buffer ATL (fra QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) til hvert rør.
6. Plasser noen dråper Buffer ATL på vevsseksjonene på objektglassene (nok til å dekke vevsoverflaten).
7. Skrap vevsområdet med en steril skalpell og putt det oppskrapte vevet oppi det tilhørende merkede mikrosentrifugerøret.
8. Tilsett 20 µl proteinase K (fra QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) til hvert rør, og bland ved vorteksering.
9. Inkuber ved 56 °C i 1 time.

Fortsett med 90 °C inkubasjonstrinnet i protokollen for QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (trinn 12 i *Håndboken for QIAamp DNA FFPE-vevssettet*, juni 2012, side 13).

Bruke QIASymphony DSP DNA Mini Kit

FORSIKTIG



Les nøye gjennom følgende modifikasjoner som må brukes på QIASymphony SP-protokollskjemaet: Tissue_LC_200_V7_DSP.

- Se "Håndtering og oppbevaring av prøver" på side 17 for klargjøring av prøver før parafinjerning og DNA-ekstraksjon.
- RNase-trinnet beskrevet i QIASymphony SP-protokollskjemaet må utføres.
- QIAGEN Deparaffinization Solution skal ikke brukes. Bruk kun xylen/etanol-metoden for parafinjerning som beskrevet i "Prosedyre for objektglassparafinjerning ved bruk av QIASymphony DSP DNA Mini Kit", nedenfor. Xylen kan byttes ut med Histolemon (xylensubstitutt).
- Proteinase K-nedbrytning må foregå i 1 time.
- 50 µl elusjonsvolum må velges på berørings skjermen.

Prosedyre for objektglassparafinjerning ved bruk av QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Gjennomfør parafinjerning i henhold til følgende trinn som skiller seg fra protokollen i QIASymphony SP-protokollskjemaet: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Plasser objektglassene i et spesifikt objektglasstativ.
2. Sett objektglasstativet oppi et objektglassbad som inneholder xylen eller histolemon, og la det stå i 2 minutter. Rist med 2 eller 3 bevegelser bakover og forover.
3. Plasser objektglasstativet oppi et objektglassbad nummer to som inneholder etanol (96–100 %), og la det stå i 2 minutter. Rist med 2 eller 3 bevegelser bakover og forover.
4. La objektglassene tørke ved 15–37 °C. Dette vil ta noen minutter.
5. Merk 1,5 ml mikrosentrifugerør for hver prøve og tilsett 220 µl Buffer ATL til hvert rør.
6. Plasser noen dråper Buffer ATL på vevsseksjonene på objektglassene (nok til å dekke vevsoverflaten).

7. Skrap vevsområdet med en steril skalpell og putt det oppskrapte vevet oppi det tilhørende merkede mikrosentrifugerøret.
8. Tilsett 20 µl proteinase K (fra QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) til hvert rør, og bland ved vorteksering.

Fortsett med 56 °C inkubasjonstrinnet i QIASymphony SP-protokollskjemat: Tissue_LC_200_V7_DSP-protokoll (trinn 12 i "Parafinfjerning ved hjelp av xylen"-protokollen, april 2012). Inkuber ved 56 °C i 1 time.

Genomisk DNA

Genomisk DNA kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 1 uke etter ekstraksjon eller i 8 uker ved –15 til –25 °C.

DNA-mengden må bestemmes ved å måle prøvens optiske tetthet (Optical Density, OD) ved 260 nm.

Fortynn DNA til en konsentrasjon på 5 ng/µl i 1x TE-buffert ved pH 8,0.

PCR-reaksjonen optimaliseres for prøver som inneholder 25 ng rensset genomisk DNA.

Protokoll: Påvisning av *IDH1/2*-mutasjoner

Viktige punkter før du starter

- For å kunne bruke *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* optimalt må prøvene være gruppert i batcher på 4. Mindre batchstørrelser innebærer at færre prøver kan testes med *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*.
- Vi anbefaler testing av alle prøver en gang per PCR-kjøring, som angitt i tabell 2, og med et lasteblokkoppsett og rotoroppsett som angitt i tabell 3 og figur 2.

Tabell 2. Antall reaksjoner for Rotor-Gene Q MDx-instrumenter med rotor for 72 rør

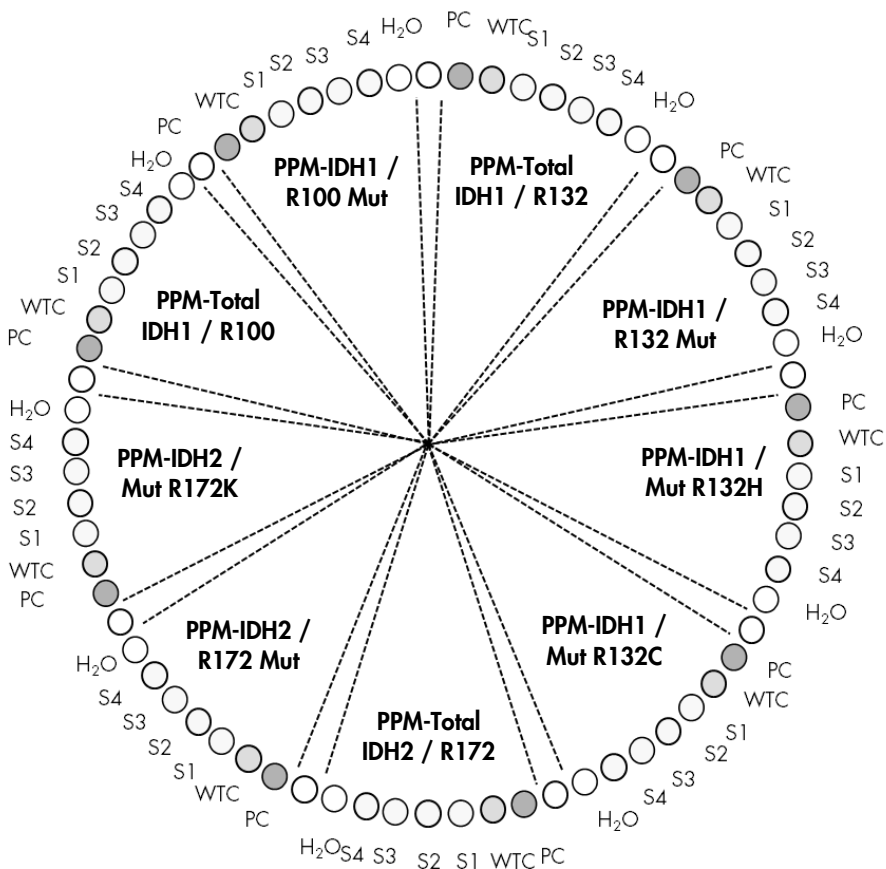
Prøver	Reaksjoner
n DNA-prøver	n × 1 reaksjon
2 DNA-kontroller	2 reaksjoner: Positive kontroller og WT-kontroller, hver testes én gang per PCR-kjøring
Vannkontroll	1 reaksjon

Tabell 3. Foreslått lasteblokk for et forsøk med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Prøve	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
WTC†	2	10	18	26	34	42	50	58	66
S1	3	11	19	27	35	43	51	59	67
S2	4	12	20	28	36	44	52	60	68
S3	5	13	21	29	37	45	53	61	69
S4	6	14	22	30	38	46	54	62	70
H ₂ O	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Tomt rør	8	16	24	32	40	48	56	64	72

* PC: Positiv kontroll.

† WTC: Villtypekontroll.



Figur 2. Foreslått rotoroppsett for et forsøk med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Viktig: Sørg alltid for å plassere en prøve i rotorens posisjon 1. Ellers vil ikke instrumentet utføre kalibrering, og feil fluorescensdata vil bli avlest.

Prosedyre

1. Tin opp alle nødvendige komponenter, og legg dem på is.
2. Klargjør følgende PCR-blandinger i henhold til antall prøver som behandles.

Merk: Alle konsentrasjoner er angitt for det endelige reaksjonsvolumet.

Tabell 4 beskriver pipetteringsskjemaet for klargjøring av én reagensblanding, beregnet på å oppnå et endelig reaksjonsvolum på 25 µl. En forhåndsblending kan fremstilles for hver PPM i henhold til reaksjonsantallet. Ekstra volummengder er inkludert for å kompensere for pipetteringsfeil.

Tabell 4. Klargjøring av PCR-blandinger

Komponent	1 reaksjon (µl)	Forhåndsblending: 7+1 reaksjoner (µl)	Sluttkonsentrasjon
qPCR forhåndsblending, 2x	12,5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Nukleasefritt vann	6,5	52	–
Prøve eller kontroll† (som skal tilsettes i trinn 4)	5	5 hver	–
Totalt volum	25	25 hver	–

* Klargjør 9 forhåndsblandinger, én med hver av PPM-ene i settet.

† Positiv kontroll negativ kontroll eller vannkontroll.

3. Tilsett 20 µl av forhåndsblendingsløsningen per Rotor-Gene-rør (tabell 3).
4. Tilsett 5 µl av materialet som skal kvantifiseres (25 ng genomisk DNA eller kontroll; Tabell 3) i riktig glass (totalvolum 25 µl; tabell 3).
5. Bland forsiktig ved å pipettere opp og ned.
6. Plasser rørene i adapteren som følger med instrumentet (figur 2).
Merk: Ubrukte posisjoner må fylles med tomme rør.
7. Sett den fulle adapteren inn i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.
8. Programmer Rotor-Gene Q MDx-instrumentet med det termiske syklusprogrammet som angitt i tabell 5.

Tabell 5. Temperaturprofil

Hold (Pause)	Temperatur: 95 °C Tid: 10 min
Cycling (Syklus)	40 ganger 95 °C i 15 s 60 °C i 60 s med innhenting av FAM™-fluorescens i kanalen Green: Single (Enkeltvis)

9. Klikk på **Gain Optimisation** (Optimal forsterkning) i dialogboksen New Run Wizard (Veiviser for ny analyse) for å åpne dialogboksen Auto-Gain Optimisation Setup (Autooppsett av optimal forsterkning). Angi området for den grønne kanalen fra **2FI** for **Min Reading** (Min. avlesning) til **10FI** for **Max Reading** (Maks avlesning).
10. Kryss av i boksen **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Utfør optimalisering før 1. innhenting), og lukk dialogboksen Auto-Gain Optimisation Setup (Autooppsett av optimal forsterkning).
11. Start det termiske syklusprogrammet.
12. Når den termiske syklusen er avsluttet, gjør du følgende:
 - 12a. Velg **Options** (Alternativer) > **Crop Start Cycles** (Kutt startsykluser). Fjern data før syklus **10** for å forkaste artefakter.
 - 12b. Velg **Analysis** (Analyse) > **Cycling A. Green from 10** (Syklus A, grønn fra 10) som i rapporten angis som "left threshold = 10.00" ("venstre terskelverdi = 10,00").
 - 12c. Velg **Dynamic Tube** (Dynamisk rør) som normaliseringsmetode og **Slope Correct** (Riktig helning) for å korrigere støyhelningen.
 - 12d. Still inn **Outlier Removal** (Avviksfjerning) til **0 %** (tilsvarende NTC-terskelverdien).
 - 12e. Still inn **Reaction Efficiency Threshold** (Terskelverdi for reaksjonseffektivitet) til deaktivert.
 - 12f. Angi **0.03** (0,03) som terskelverdi.
 - 12g. Still inn grafen til lineær skala.
 - 12h. Velg **Digital Filter** (Digitalt filter): **Light** (Lett).

Tolkning av resultater

Vannkontroller

Vannkontroller (ingen templatkontroller) bør gi null C_T -verdier for alle primer- og probeblandinger.

Hvis en positiv C_T -verdi oppnås med en vannkontroll, er det et resultat av en krysskontaminering. Se "Feilsøkingsveiledning" på side 36 for å finne en løsning.

Kvalitetskontroll ved hjelp av C_T -verdier for kontroller

Med *IDH1/2*-villtypekontrollen (Wild-Type Control, WTC) og den muterte *IDH1/2*-positive kontrollen (Mut-PC) kan forsøket bli godkjent.

- Hvis det ikke er en C_T -verdi, er kontrollen klassifisert som mutasjonsnegative for den respektive påvisningsanalysen.
- Hvis C_T -verdier påvises, skal ΔC_T beregnes på følgende måte for hver kontroll

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

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

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

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

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

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

Kontroller klassifiseres som mutasjonspositive hvis ΔC_T -verdiene er lavere enn eller like de respektive ΔC_T -cutoff-verdiene som oppgis i tabell 6. Hvis ΔC_T -verdien er høyere enn cutoff, blir kontrollen klassifisert som mutasjonsnegativ for den aktuelle mutasjonsanalysen.

Tabell 6. Cutoff-verdier for hver mutasjonsanalyse

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

- *IDH1/2*-villtypekontrollen må være påvist som mutasjonsnegativ for hver mutasjonsanalyse (tabell 7).
- Den muterte *IDH1/2*-positive kontrollen må være påvist som mutasjonspositiv for hver mutasjonsanalyse (tabell 7).

Hvis ett eller begge vilkårene ikke er oppfylt, vil hele forsøket bli avvist.

Tabell 7. Eksempel på kjøringervalidering for kontroller

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

Validering av prøveinput

Prøveinput må valideres før tolkning.

C_T -verdien som oppnås for en prøve med hver PPM-totalblanding ($C_{T \text{ Total IDH1/R132 Total IDH2/R172}}$ og $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) må være lavere enn 32,00. C_T Total-verdier $\geq 32,00$ forekommer på grunn av DNA av dårlig kvalitet. Prøven må testes på nytt. Hvis kvantiteten av DNA fortsatt er utilstrekkelig, må du ekstrahere mer tumorvev hvis det lar seg gjøre (se "Feilsøkningsveiledning" på side 36).

Prøveresultater

IDH1/2-mutasjonspåvisning

For hver prøve beregner du ΔC_T -verdiene som ble oppnådd med hver påvisningsmutasjonsanalyse (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut og PPM-IDH1/R100 Mut) som følger:

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

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

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

Hvis det ikke er noen C_T -verdi for en mutasjonsdekteksjonsanalyse, må prøven klassifiseres som mutasjonsnegativ for den aktuelle mutasjonen.

Prøver klassifiseres som mutasjonspositive hvis ΔC_T -verdien er lavere enn eller lik ΔC_T -cutoff-verdien for den respektive mutasjonspåvisningsanalysen, som oppgis i tabell 8.

Tabell 8. Cutoff-verdier for hver mutasjonspåvisningsanalyse

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

IDH1/2-mutasjonsidentifisering

For hver prøve beregner du ΔC_t -verdiene som ble oppnådd med hver identifiseringsmutasjonsanalyse (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C og PPM-IDH2 Mut R172K), som følger:

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

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

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

Hvis det ikke er noen C_t -verdi for en mutasjonsidentifiseringsanalyse, må prøven bli klassifisert som mutasjonsnegativ.

Prøvemutasjon identifiseres hvis ΔC_t -verdien er lavere enn eller lik ΔC_t -cutoff-verdien for den respektive mutasjonsidentifiseringsanalysen som oppgis i tabell 9. Eksempler på ΔC_t -tolkning er vist i tabell 10 og tabell 11.

Tabell 9. Cutoff-verdier for hver mutasjonsidentifiseringsanalyse

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

Tabell 10. Eksempel på IDH1/2-mutasjonspåvisning

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

Tabell 11. Eksempel på IDH1/2-mutasjonsidentifisering

Verdi	Prøve 1	Prøve 2
C_T Total IDH1/R132	26,39	26,32
C_T IDH1 Mut R132H	33,82	28,27
ΔC_T IDH1 Mut R132H	7,43	1,95
C_T Total IDH1/R132	26,39	26,32
C_T IDH1 Mut R132C	37,94	Ikke påvist
ΔC_T IDH1 Mut R132C	11,55	ikke relevant
C_T Total IDH2/R172	26,79	25,79
C_T IDH2 Mut R172K	Ikke påvist	Ikke påvist
ΔC_T IDH2 Mut R172K	ikke relevant	ikke relevant
Mutasjonsidentifisering	Ingen mutasjon påvist	Mutasjon påvist for R132H

Tolkning av *IDH1/2*-mutasjoner

Prosedyren som brukes til å tilordne *IDH1/2*-mutasjonstype til prøver som er positive for en *IDH1/2*-mutasjon er vist i tabell 12. Et eksempel på tolkningen vises i tabell 13.

Tabell 12. Tolkningsveiledning

		Mutasjonsidentifisering			
		<i>IDH1</i> Mut R132H påvist	<i>IDH1</i> Mut R132C påvist	<i>IDH2</i> Mut R172K påvist	Ingen mutasjon påvist
Mutasjonspåvisning	R132-mutasjon påvist	R132H-mutasjon påvist	R132C-mutasjon påvist	–	R132-mutasjon, men hverken R132H eller R132C
	R172-mutasjon påvist	–	–	R172K-mutasjon påvist	R172-mutasjon, men ikke R172K
	R100-mutasjon påvist	–	–	–	R100
	Ingen mutasjon påvist	Lavt innhold av R132H-mutasjon påvist (mellom 1 % og 2 %)*	Lavt innhold av R132C-mutasjon påvist (mellom 1 % og 4%)*	Lavt innhold av R172K-mutasjon påvist (cirka 1 %)*	Ingen mutasjon påvist

* Disse tilfellene kan oppstå en sjelden gang, og alle prøver samt tekniske akseptkriterier bør kontrolleres, spesielt tumorcelleinnhold. Hvis alle kriteriene er oppfylt, må prøven kjøres på nytt.

Tabell 13. Eksempel på *IDH1/2*-mutasjonsrapportering og -tolkning

	Prøve 1	Prøve 2
Mutasjonspåvisning	Ingen mutasjon påvist	R132-mutasjon påvist
Mutasjonsidentifisering	Ingen mutasjon påvist	Mutasjon påvist for R132H
Tolkning av resultater	Ingen mutasjon påvist eller identifisert	R132H-mutert

Merk: Hvis en prøve har 2 eller flere ΔC_T -verdier mindre enn eller lik ΔC_T cutoff-verdiene, tilordnes mutantstatusen til mutasjonen med den største forskjellen mellom cutoff-verdien og oppnådd ΔC_T . Se eksempel i tabell 14.

Tabell 14. Eksempel på tolkning i tilfelle av flere positive resultater

	Prøve 3	Prøve 4
ΔC_T <small>IDH1/R132 Mut</small>	1,24	5,24
ΔC_T cutoff <small>IDH1/R132 Mut</small>	5,34	5,34
$(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ <small>IDH1/R132 Mut</small>	4,10	0,10
ΔC_T <small>IDH2/R172 Mut</small>	5,32	5,95
ΔC_T cutoff <small>IDH2/R172 Mut</small>	6,42	6,42
$(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ <small>IDH2/R172 Mut</small>	1,10	0,47
Tolkning av resultater	R132-mutert	R172-mutert

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Du finner mer informasjon på www.qiagen.com.

Kommentarer og forslag

Tett kolonne under DNA-ekstraksjon

Ufullstendig lysering

Gjenta sentrifugering.

Det gjenværende lysatet kan overføres til en ny kolonne.

Gjenta ekstraksjonskjøringen med mindre FFPE-vev.

Utilstrekkelig DNA i ekstraksjonseluatet

Utilstrekkelig FFPE-vevsområde

Gjenta ekstraksjonskjøringen med en større FFPE-vevsseksjon / flere FFPE-vevsseksjoner.

IDH1/2 WT-kontroll ikke påvist

a) Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser, rør eller brønnombyting

Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet.

Gjenta PCR-kjøringen.

b) Feil oppbevaring av settkomponenter

Oppbevar *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ved -30 til -15 °C, og sørg for at primer- og probeblandinger er beskyttet mot lys. Se "Oppbevaring og håndtering av reagenser" på side 16.

Maks 5 fryse-tine-sykluser kan benyttes.

c) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit har gått ut på dato.

Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til reagensene, og bruk om nødvendig et nytt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

IDH1/2-positive kontroller ikke påvist

a) Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser, rør eller brønnombyting

Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet.

Gjenta PCR-kjøringen.

Kommentarer og forslag

- b) Feil oppbevaring av settkomponenter Oppbevar *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ved -30 til -15 °C, og sørg for at primer- og probeblandinger er beskyttet mot lys. Se "Oppbevaring og håndtering av reagenser" på side 16.
Maks 5 fryse-tine-sykluser kan benyttes.
- c) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit har gått ut på dato. Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til reagensene, og bruk om nødvendig et nytt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Ingen signal, inkludert ingen signal for kontroller

- a) Ingen reaksjonsrør i posisjon 1 på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet Sørg alltid for å plassere en prøve i rotorens posisjon 1. Ellers vil ikke instrumentet utføre kalibrering, og feil fluorescensdata vil bli avlest.
- b) Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser, rør eller brønnombyting Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet.
Gjenta PCR-kjøringen.
- c) Feil oppbevaring av settkomponenter Oppbevar *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ved -30 til -15 °C, og sørg for at primer- og probeblandinger er beskyttet mot lys. Se "Oppbevaring og håndtering av reagenser" på side 16.
Maks 5 fryse-tine-sykluser kan benyttes.
- d) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit har gått ut på dato. Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til reagensene, og bruk om nødvendig et nytt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- e) Feil påvisningskanal valgt Still inn påvisningskanalen til Cycling Green (syklus grønn) eller 530 nm/640 nm.
- f) Ingen datainnsamlingsprogrammer Kontroller syklusprogrammet. Se Tabell 5, side 26.
Velg innsamlingsmodusen **Single** (Enkeltvis) ved slutten av hvert hybridiseringssegment i PCR-programmet.

Kommentarer og forslag

Fluorescensintensiteten varierer

Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser, rør eller brønnombyting

Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet.
Gjenta PCR-kjøringen.

Fluorescensintensiteten er for lav

- a) Feil oppbevaring av settkomponenter
- Oppbevar *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ved -30 til -15 °C, og sørg for at primer- og probeblandinger er beskyttet mot lys. Se "Oppbevaring og håndtering av reagenser" på side 16.
- Maks 5 fryse-tine-sykluser kan benyttes.
- b) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit har gått ut på dato.
- Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til reagensene, og bruk om nødvendig et nytt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- c) Svært lav mengde av mål-DNA
- Kontroller alltid DNA-konsentrasjonen før start. Se "DNA-ekstraksjon og klargjøring" på side 18.

Negativ kontroll (H₂O) gir et positivt resultat

Krysskontaminering, reagenskontaminering, instrumentfeil, brønn- eller kapillarrørombyting, eller probe degradering

Bytt ut alle kritiske reagenser med nye, eller bruk et nytt *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Sørg for alltid å håndtere prøver, settkomponenter og forbruksartikler i samsvar med allment akseptert praksis for å forhindre medrivingskontaminering.

Primer- og probeblandinger må være beskyttet mot lys.

Se etter falskt positive prøver på fluorescenskurver.

Kontroller reaksjonsoppsettet. Se "Protokoll: Påvisning av IDH1/2-mutasjoner" på side 22.

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet. Analysesertifikater er tilgjengelige på forespørsel på www.qiagen.com/support.

Begrensninger

Settet er beregnet for profesjonell bruk.

Produktet skal bare brukes av personell som har fått spesialinstruksjoner og -opplæring i molekylær-biologiske teknikker og som er kjent med denne teknologien.

Dette settet bør brukes i henhold til instruksjonene i denne håndboken, i kombinasjon med et godkjent instrument nevnt i "Materialer som er nødvendige, men ikke følger med", side 12.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene som er angitt på komponentenes esker og etiketter. Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit er kun godkjent for bufret formalinfiksert, parafininnstøpt hjernevev.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit er kun godkjent for bruk med QIAamp DNA FFPE Tissue Kit eller QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Kun Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (for PCR) og QIASymphony SP (for prøveklargjøring) har blitt godkjent.

Annen bruk av dette produktet enn det som angis på etikettene og/eller modifisering av komponentene vil annullere QIAGENs ansvar.

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for eventuelle prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av QIAGENs ytelsesundersøkelser.

Testen er utformet for å påvise 7 mutasjoner i kodon 132 og 100 på *IDH1*-genet og 5 mutasjoner i kodon 172 på *IDH2*-genet. Prøver med resultater rapportert som "no mutation detected" (ingen mutasjon påvist), kan inneholde *IDH1*- eller *IDH2*-mutasjoner som ikke ble påvist ved analysen.

Påvisning av mutasjoner avhenger av prøveintegritet, tumorinnholdet og amplifiserbart DNA som er til stede i prøven.

Diagnostiske resultater som genereres med produktet må tolkes innenfor konteksten av alle relevante kliniske funn eller laboratoriefunn.

Ytelsesegenskaper

Grense for blank prøve (LOB)

Grense for blank prøve (Limit of blank, LOB) ble bestemt (i samsvar med CLSI/NCCLS EP17-A-retningslinjen; 14) på negative prøver (normalt FFPE-hjernevev, 8 prøver, 64 målinger/parti, 2 partier).

LOB-resultatene vises i tabell 15.

Tabell 15. Grense for blank prøve (Limit of blank, LOB)

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

Deteksjonsgrense (Limit of Detection, LOD)

Deteksjonsgrensen (LOD eller analytisk sensitivitet) ble bestemt basert på "presisjonsprofil-fremgangsmåten" beskrevet i CLSI/NCCLS EP17-A-retningslinjen (14). Fem svakt positive prøver (plasmid-DNA tilsatt til villtypegliom-DNA) ble brukt per mutasjon (30 til 110 målinger per mutasjonstype og mutasjonsprosentandel).

LOD-resultatene vises i tabell 16.

Tabell 16. Deteksjonsgrense (Limit of Detection, LOD)

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

En mutasjon påvises hvis ΔC_T -verdien er lavere enn eller lik LOD.

Effekten av DNA-input

DNA ble ekstrahert fra 4 forskjellige gliomprøver: 2 med villtype-*IDH1/2* og 2 som bar *IDH1* R132H-mutasjonen (395G>A).

Tre forskjellige DNA-mengder (inkludert den som anbefales for protokollen) ble testet for å evaluere virkningen av DNA-input på kvalitative resultater. Resultatene viste at DNA-input ikke hadde noen innvirkning på kvalitative resultater. Flere tekniske feil (C_T Total QC feil) ble imidlertid observert for DNA-input som var lavere enn anbefalt input (<25 ng DNA). Følgelig anbefales en input på 25 ng DNA i et volum på 5 µl for å kjøre testen.

Repeterbarhet og reproduserbarhet

Presisjonsstudien ble utført på 4 forskjellige prøver (plasmid-DNA tilsatt til villtypegliom-DNA representativt for en villtype-, mutant- og cutoff-prøve) som ble testet 40 ganger i to serier (n = 80 målinger).

Standardavvik (SD) og variasjonskoeffisienter (Coefficients of Variation, CV) oppgis i tabell 17.

Tabell 17. Presisjonsresultater

Analyse	Prøve	Gj.sn. ΔC_T	SD _g *	SD _{kjøring} [†]	SD _{total} [‡]	CV _{total} (%) [‡]	Korrekt funnandel
R132C Mut	WT	11,58	1,08	0,00	1,11	10	100 % (78/78)
	5 %	5,19	0,26	0,23	0,46	9	100 % (76/76)
	10 %	4,37	0,27	0,14	0,48	11	100 % (78/78)
	30 %	2,62	0,20	0,21	0,46	18	100 % (78/78)
R132H Mut	WT	10,87	1,48	0,00	1,48	14	100 % (78/78)
	5 %	4,46	0,27	0,05	0,31	7	100 % (78/78)
	10 %	3,57	0,28	0,14	0,31	9	100 % (76/76)
	30 %	1,86	0,21	0,20	0,30	16	100 % (72/72)
R172K Mut	WT	12,20	0,31	0,17	0,39	3	100 % (66/66)
	5 %	6,19	0,50	0,00	0,63	10	100 % (76/76)
	10 %	5,23	0,32	0,20	0,48	9	100 % (76/76)
	30 %	3,68	0,18	0,11	0,36	10	100 % (76/76)

* R: repeterbarhet

† Kjøring: reproduserbarheten mellom kjøringene

‡ Total: total presisjon (inkludert mellom instrumenter, mellom operatører og mellom loter).

Tabellen fortsetter på neste side.

Tabell 17. Presisjonsresultater (forts.)

Analyse	Prøve	Gj.sn. ΔC_T	SD_R^*	$SD_{Kjøring}^\dagger$	SD_{Total}^\ddagger	$CV_{Total} (\%)^\ddagger$	Korrekt funnandel
R100 Mut	WT	7,21	0,41	0,27	0,52	7	100 % (70/70)
	5 %	3,68	0,27	0,16	0,33	9	100 % (76/76)
	10 %	2,93	0,24	0,15	0,32	11	100 % (76/76)
	30 %	1,56	0,25	0,07	0,26	17	100 % (76/76)
R132 Mut	WT	8,01	0,76	0,00	0,78	10	100 % (152/152)
	R132H 5 %	4,29	0,30	0,15	0,48	11	99 % (151/152)
	R132C 5 %	4,44	0,30	0,00	0,56	13	
	R132H 10 %	3,49	0,27	0,22	0,46	13	99 % (151/152)
	R132C 10 %	3,69	0,27	0,23	0,53	14	
	R132H 30 %	1,87	0,21	0,02	0,33	18	100 % (152/152)
	R132C 30 %	2,00	0,26	0,28	0,59	29	
R172 Mut	WT	9,47	0,91	0,87	1,45	15	100 % (66/66)
	5 %	4,45	0,35	0,12	0,56	13	100 % (76/76)
	10 %	3,55	0,29	0,02	0,53	15	100 % (76/76)
	30 %	2,05	0,18	0,15	0,47	23	100 % (76/76)

* R: repeterbarhet

† Kjøring: reproduserbarheten mellom kjøringene

‡ Total: total presisjon (inkludert mellom instrumenter, mellom operatører og mellom loter).

Metodesammenligning

Sammenligning med immunhistokjemi (Immunohistochemistry, IHC) for påvisning av *IDH1/R132H*.

En studie ble utført for å demonstrere samsvar mellom mutasjonsstatus vurdert med *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* og ved IHC (anti-human *IDH1 R132H*-antistoffklon H09, DIANOVA).

Totalt ble 103 kliniske gliomprøver utvalgt. Den eldste blokken var 10 år gammel.

Alle prøvene bestod kvalitetskontroller for både *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* og IHC.

Resultatene viste et positivt prosentvis samsvar (Positive Percentage Agreement, PPA) på 100 %, et negativt prosentvis samsvar (Negative Percent Agreement, NPA) på 98 % og et samlet samsvar (Overall Agreement, OA) på 99 % (tabell 18).

Tabell 18. Analyse av samsvar mellom *therascreen* RGQ PCR Kit og IHC

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

Sammenligning med bidireksjonal sekvensering

En studie ble utført for å demonstrere samsvar mellom mutasjonsstatus vurdert med *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit og ved bidireksjonal sekvensering.

Totalt ble 103 kliniske tumorprøver fra gliompasienter utvalgt. Den eldste blokken var 10 år gammel.

Alle 103 prøvene bestod kvalitetskontrollene for *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, og 101 prøver ga resultater for bidireksjonal sekvensering.

Resultatene viste et positivt prosentvis samsvar (Positive Percentage Agreement, PPA) på 100 %, et negativt prosentvis samsvar (Negative Percent Agreement, NPA) på 92 % og et samlet samsvar (Overall Agreement, OA) på 96 % (tabell 19 og 20).

Tabell 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit vs. bidireksjonal sekvensering

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

* R132 R132 betyr at prøven ble funnet å være mutert for en R132-mutasjon, men hverken for R132H eller R132C.

† R172 betyr at prøven ble funnet å være mutert for en R172-mutasjon, men ikke for R172K.

Tabell 20. Analyse av samsvar med bidireksjonal sekvensering

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

Referanser

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

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

Symboler

Følgende tabell beskriver symbolene som kan opptre på merkingen eller i dette dokumentet.



<N>

Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner



Siste forbruksdato



In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer (dvs. komponentmerking)



Komponenter (dvs. en liste over hva som er inkludert)



Inneholder (innhold)



Antall (dvs. hetteglass, flasker)

Rn

R står for revisjon av håndboken, og n er revisjonsnummeret



Globalt artikkelnummer



Temperaturbegrensninger



Produsent



Se bruksanvisningen



Forsiktig

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	Til 20 reaksjoner: 9 primer- og probeblandinger, WT-kontroll, positiv kontroll, forhåndsblending, nukleasefritt vann	873011
Rotor-Gene Q MDx og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Sanntids PCR-syklus og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1 års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Sanntids PCR-cyklus med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer 1-års garanti på deler og utføring; installasjon og opplæring ikke inkludert	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med en enkeltkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remser med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remser med 4 rør og lokk til 10 000 reaksjoner	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – for rensing av genomisk DNA fra parafininnstøpte vev		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargjøringer: 50 QIAamp MinElute®-kolonner, Proteinase K, buffere, Collection Tubes (2 ml)	56404

Produkt	Innhold	Kat.nr.
QIASymphony DSP DNA Mini Kit – for automatisert rensing av DNA fra 1–96 prøver		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	For 192 klargjøringer på 200 µl hver: Inkluderer 2 reagenskassetter og enzymstativer og tilbehør	937236
QIASymphony SP og tilbehør		
QIASymphony SP System	QIASymphony-prøveklargjøringsmodul: inkluderer installasjon og opplæring, 1 års garanti på deler og arbeid	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony-prøveklargjøringsmodul: Inkluderer 1 års garanti på deler og arbeid	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Prøveklargjøringskassetter med 8 brønner for bruk med QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8 Rod Covers til bruk med QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Engangsfilterspisser, i stativ (8 x 128). Til bruk med QIAcube- og QIASymphony SP/AS-instrumenter	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Engangsfilterspisser, i stativ (8 x 128). Til bruk med QIASymphony SP/AS-instrumenter	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Usterile polypropylenrør (0,85 ml maksimumskapasitet, mindre enn 0,7 ml oppbevaringskapasitet, 0,4 ml elueringskapasitet), 2304 i stativ på 96, inkludert lokkremser	19588

Produkt	Innhold	Kat.nr.
Reagenser		
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml, 7000 enheter/ml, løsnig)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml vevslyseringsbuffer for 1000 klargjøringer	19076

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, kan du se i håndboken eller bruksanvisningen for det aktuelle QIAGEN-settet. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN Kit er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENs tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren.

Endringshistorikk for dokument

Dato	Endringer
R5, juli 2020	<p>Delen Tolkning av resultater er revidert for å legge til informasjon om klassifisering av kontroller og prøver avhengig av deteksjon av Ct-verdi</p> <p>Revidert kolonne for IDH1/IDH2 WT-kontroll i tabell 7 for C_T IDH Mut R172K og $\Delta C_{T \text{ IDH2 Mut R172K}}$</p> <p>Reviderte kolonner for prøve 1 og prøve 2 i tabell 11 for C_T IDH1 Mut R132C, $\Delta C_{T \text{ IDH1 Mut R132C}}$, C_T IDH2 Mut R172K og $\Delta C_{T \text{ IDH2 Mut R172K}}$</p>

Denne siden skal være tom

Begrenset lisensavtale for *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens når det gjelder noen av QIAGENS åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet sammen med andre komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse ytterligere protokollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette settet og/eller bruk av det ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette settet og komponentene i det er lisensiert for engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller underforstått, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuell intellektuell eiendomsrett forbundet med settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

Dette produktet er beregnet til bruk i *in vitro*-diagnostikk. QIAGEN-produkter kan ikke selges videre, modifiseres for videregående salg eller brukes til å produsere kommersielle produkter uten skriftlig godkjenning fra QIAGEN.

Informasjon i dette dokumentet kan endres uten forvarsel. QIAGEN påtar seg ikke ansvar for noen feil som kan forekomme i dette dokumentet. Dette dokumentet anses å være fullstendig og nøyaktig på utgivelsestidspunktet. QIAGEN er under ingen omstendigheter ansvarlig for tilfældige, spesielle eller flere skader eller følgeskader i forbindelse med eller som resultat av bruken av dette dokumentet.

QIAGEN-produkter er garantert å oppfylle de spesifikasjonene som er angitt. QIAGENS eneste ansvar og kundens eneste rettsmiddel er begrenset til kostnadsfri erstatning av produkter hvis produktene ikke fungerer i samsvar med garantien.

Innkjøpet av dette produktet gjør det mulig for kjøperen å bruke det til å utføre diagnostikkjenester for human *in vitro*-diagnostikk. Det gis ingen generelle patent- eller andre lisensrettigheter i forbindelse med kjøpet bortsett fra bruksretten.

IDH1/2-mutasjoner og bruken av disse er beskyttet av patentrettigheter, inkludert europeiske patentsøknader EP2326735 og EP2546365, amerikanske patentsøknader US2011229479 og US2012202207 og utenlandske motstykker.

Kjøp av dette produktet gir ikke rett til bruk for kliniske studier for IDH1/2-målrrettede legemidler. QIAGEN utvikler spesifikke lisensprogrammer for slike bruksområder. Ta kontakt med vår juridiske avdeling på adhlicenses@qiagen.com.

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

1119896 07-2020 HB-1566-005 © 2020 QIAGEN, med enerett.

