Juli 2022

Bruksanvisningen för *ipsogen*® JAK2 RGQ PCR Kit

24

Version 2

IVD

För in vitro-diagnostisk användning

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

CE	0197
REF	674623
	QIAGEN, GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND
R1 MAT	1123592SV

Sample to Insight

Innehåll

Avsedd användning 6

Avsedd användare 6

Beskrivning och princip 7

- Sammanfattning och förklaring 7
- Testprincipen 11

Material som medföljer 15

- Kitinnehåll 15
- Kitets innehåll (forts.) 16
- Paketets innehåll 17

Material som behövs men inte medföljer 19

- Förbrukningsartiklar och reagenser för manuell DNA-extraktion 19
- Förbrukningsartiklar och reagenser för automatisk DNA-extraktion 19
- Förbrukningsartiklar och reagenser för PCR 19
- Utrustning 20
- Provberedningsutrustning 20
- Utrustning för real-time PCR 20

Varningar och försiktighetsåtgärder 21

- Säkerhetsinformation 21
- Vid nödsituationer 21
- Försiktighetsåtgärder 22

Förvaring och hantering av reagenser 24

- Leveransvillkor 24

Förvaringsförhållanden 24
Användningsstabilitet 25
Förvaring och hantering av prover 26
Helblodsprover 26
Prover med genomiskt DNA 26
Protokoll: Extraktion och beredning av genomiskt DNA från helblod 27
Manuell extraktion av genomiskt DNA med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit 27
Automatisk extraktion av genomiskt DNA med QIAsymphony DSP DNA Mini Kit 31
Kvalificering och kvantifiering av DNA 36
Normalisering av prov med genomiskt DNA 36
Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet 37
Installation av den grundläggande programvaran till Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 38
Installation av Gamma-plugin-programmet och import av analysprofilen 39
Provbearbetning på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72 rör 42
qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72 rör 45
Tolkning av resultat 58
Begränsningar 65
Prestandaegenskaper 67
Analytisk prestanda 67
Test av Genomik JAK2 V617F (NIBSC, panelkod 16/120) av WHO:s internationella referenspanel. 75
Klinisk prestanda 82
Säkerhets- och prestandasammanfattning 89

Bortskaffning 90
Referenser 91
Felsökningsguide 93
Symboler 98
Beställningsinformation 100
Dokumentrevisioner 103

Avsedd användning

ipsogen® JAK2 RGQ PCR Kit är en kvantitativ in vitro PCR-analys för detektion och kvantifiering av JAK2 V617F/G1849T-mutation i genomiskt DNA extraherat från humant perifert helblod med antikoagulerat med 2K-EDTA. Resultat som erhålls med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit är avsedda som komplement vid bedömning av misstänkta Philadelphia (Ph)-kromosomer, negativa myeloproliferativa neoplasmer (MPN) och för övervakning av molekylära sjukdomar hos MPN-patienter. Alla diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska, patologiska fynd.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit ska enbart användas med QIAGEN Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM -instrumentet och andra godkända arbetsflödeskomponenter som anges i bruksanvisningen. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit är inte en automatiserad enhet men analysen utförs med hjälp av en dedikerad programvara.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit är avsett för in vitro-diagnostisk användning.

Avsedd användare

Det här kitet är avsett för professionell användning.

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

Beskrivning och princip

Sammanfattning och förklaring

En återkommande somatisk mutation, *V617F*, som påverkar Janus-tyrosinkinas 2-genen (*JAK2*) identifierades 2005 (1–4), vilket ledde till ett stort genombrott när det gällde att förstå, klassificera och diagnostisera MPN. JAK2 är en mycket viktig intracellulär signalmolekyl för ett antal cytokiner, inklusive erytropoietin.

JAK2 V617F-mutationen detekteras hos > 95 % av patienterna med polycytemia vera (PV) och hos ca 60 % av patienterna med essentiell trombocytemi (ET) och primär myelofibros (PMF) (5). I sällsynta fall har *JAK2 V617F* även detekterats i samband med myelomonocytisk leukemi, myelodysplastiskt syndrom (MDS), systemisk mastocytos och kronisk neutrofil leukemi, men till 0 % i samband med kronisk myeloisk leukemi (CML) (6).

JAK2 V617F-mutationen korresponderar till en enskild nukleotidförändring i JAK2-nukleotiden 1849 i exon 14, vilket resulterar i en unik substitution av valin (V) till fenylalanin (F) vid position 617 i proteinet (JH2-domänen). JAK2-genen avkodar tyrosinkinas relaterad till cytokinreceptorssignalering via STAT-banan. Om konstant aktiverad, vanligtvis med hjälp av *JAK2 V617F*-mutationen, omvandlas erytroidprogenitorer och hyperkänslighet till erytropoietin för vidare aktivering i underordnade signalbanor. Rent hypotetiskt går det att anta att den oreglerade JAK2 främjar onkogenen reaktion, mitotisk rekombination och genetisk instabilitet (7).

Traditionellt sett har diagnos av MPN-sjukdomar baserats på kliniska, benmärgshistologiska och cytogenetiska kriterier. Upptäckten av en sjukdomsspecifik molekylär markör resulterade i både en förenklad process och förbättrad diagnostisk precision. Detektion av *JAK2 V617F*-mutationen är en del av referenskriterierna hos World Health Organization (WHO) 2016 för diagnos av BCR- ABL-negativ MPN (8) (tabell 1), och förekomst av den här mutationen är ett huvudkriterium för bekräftad diagnos.

Tabell 1. WHO-kriterier för diagnos av MPN

Kriterier för diagnos av PV

Huvudkriterier	1.	Hemoglobin (Hgb) > 16,5 g/dL (män) eller > 16,0 g/dL (kvinnor) eller hematocrit > 49 % (män) eller > 48 % (kvinnor) eller ökad röd cellmassa > 25 % över genomsnittet för förväntat normalvärde.
	2.	Benmärgsbiopsi (BM) som visar hypercellularitet för åldern med trilinjär tillväxt (panmyelos) inklusive framträdande erytroid, granulocytisk och megakaryocytär proliferation med pleomorfa, mogna megakaryocyter (storleksskillnader)
	3.	Förekomst av *JAK2V617F*- eller JAK2 exon 12-mutation
Underordnade kriterier	Serumerytropoietinnivå under det normala	

Vid diagnos av PV krävs att alla tre huvudkriterier uppnås eller de två första huvudkriterierna och det lägre kriteriet†.

† Kriterium nr 2 (BM-biopsi) behöver inte uppnås i vissa fall av ihållande absolut erytrocytos: hemoglobinnivåer >18,5 g/dL hos män (hematokrit, 55,5 %) eller >16,5 g/dL hos kvinnor (hematokrit, 49,5 %) om det tredje huvudkriteriet och det lägre kriteriet uppfylls. Begynnande myelofibros (finns hos upp till 20 % av patienterna) kan dock endast detekteras via BM-biopsi. Med hjälp av resultaten går det att förutsäga en snabbare utveckling för att besegra uppenbar myelofibros (post-PV MF).

Kriterier för diagnos av ET

Huvudsakliga	1.	Antal trombocyter ≥ 450 x 10^9/l
	2.	Benmärgsbiopsi (BM) som visar huvudsakligen proliferation av megakaryocyter med ökad mängd förstorade, mogna megakaryocyter med kraftigt lobulerade cellkärnor. Ingen signifikant ökning eller vänsterförskjutning i neutrofila granulocyter eller erytropoes, och mycket sällan en mildare (klass 1) ökning av retikulinfibrer
	3.	Uppfyller inte WHO-kriterierna för *BCR-ABL1*+ CML, PV, PMF, myelodysplastiska syndrom eller andra myeloida neoplasmer
	4.	Förekomst av *JAK2*-, *CALR*- eller *MPL*-mutation
Underordnade kriterier	Förekomst av en klonal markör eller inga tecken på reaktiv trombocytos	

Vid diagnos av ET krävs att alla fyra huvudkriterier uppnås eller de tre första huvudkriterierna och det lägre kriteriet.

Kriterier för diagnos av prePMF

Huvudsakliga	1.	Megakaryocytproliferation och -atypi, utan retikulinfibros > klass 1, i samband med ökad, åldersjusterad BM-cellularitet, granulocytisk proliferation och ofta minskad erytropoiesis
	2.	Uppfyller inte WHO-kriterierna för *BCR-ABL1*⁺ CML, PV, ET, myelodysplastiska syndrom eller andra myeloida neoplasmer
	3.	Förekomst av *JAK2*-, *CALR*- eller *MPL*-mutation eller i frånvaro av dessa mutationer, förekomst av annan klonal markör † eller frånvaro av mindre reaktiv BM-retikulinfibros‡
Underordnade kriterier	Förekomst av minst en av följande, bekräftad vid två på varandra följande bestämningar:	
	a.)	Anemi som inte kan tillskrivas komorbida tillstånd
	b.)	Leukocytos ≥ 11 X10⁹/l
	c.)	Palpabel splenomegali
	d.)	Laktatdehydrogenas (LDH) till över övre normalgränsen enligt referensintervallet

Vid diagnos av prePMF krävs att alla tre huvudkriterier uppnås och minst ett lägre kriterium.

† Vid frånvaro av någon av de tre huvudsakliga klonala mutationerna kan du söka efter de mest frekvent medföljande mutationerna (t.ex *ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1*) för att avgöra sjukdomens klonala natur.

‡ Mildare form (klass 1) retikulinfibros är sekundär till infektion, autoimmuna sjukdomar eller andra kroniska, inflammatoriska tillstånd, hårcellsleukemi eller annan lymfoid neoplasm, metastaserande elakartade former eller toxisk (kronisk) myelopati.

Kriterier för diagnos av uppenbar PMF

Huvudsakliga	1.	Förekomst av megakaryocytproliferation och -atypi i samband med antingen retikulin- och/eller kollagenfibros i klass 2 eller 3
	2.	Uppfyller inte WHO-kriterierna för ET, PV, *BCR-ABL1*+ CML, myelodysplastiska syndrom eller andra myeloida neoplasmer
	3.	Förekomst av JAK2-, CALR- eller MPL-mutation eller i frånvaro av dessa mutationer, förekomst av annan klonal markör † eller frånvaro av reaktiv myelofibros‡
Underordnade kriterier	Förekomst av minst en av följande, bekräftad vid två på varandra följande bestämningar:	
	a.)	Anemi som inte kan tillskrivas komorbida tillstånd
	b.)	Leukocytos ≥ 11 X10⁹/l
	c.)	Palpabel splenomegali
	d.)	Laktatdehydrogenas (LDH) till över övre normalgränsen enligt referensintervallet
	e.)	Leukoerytroblastos

Vid diagnos av uppenbar PMF krävs att alla tre huvudkriterier uppnås och minst ett lägre kriterium.

† Vid frånvaro av någon av de tre huvudsakliga klonala mutationerna kan du söka efter de mest frekvent medföljande mutationerna (t.ex. ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2 och SF3B1) för att avgöra sjukdomens klonala natur.

‡ BM-fibros är sekundär till infektion, autoimmuna sjukdomar eller andra kroniska, inflammatoriska tillstånd, hårcellsleukemi eller annan lymfoid neoplasm, metastaserande elakartade former eller toxisk (kronisk) myelopati.

Obs! CML: Kronisk myeloisk leukemi, ET: Essentiell trombocytemi, PMF: Primär myelofibros, PV: Polycetemia vera, WHO: Världshälsoorganisationen

Upptäckten av *JAK2 V617F*-mutationer hos MPN-patienter har dessutom lett till nya behandlingsmål. Vid mätning av *JAK2 V617F*-mutationsbelastningen under övervakning av molekylära sjukdomar har visat sig vara behjälpligt för att bedöma svar på behandlingar och för att kunna förutse återfall hos patienter som går igenom allogen stamcellstransplantation (9). Koncepten för molekylär respons avgörs i enlighet med de senaste rekommendationerna från ELN (European LeukemiaNet) och IWG-MRT (International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment) (10, 11). De är även refererade i riktlinjerna för NCCN (National Comprehensive Cancer Network) (12) och ESMO (European Society of Medical

Oncology) (5). Fullständig molekylär respons (Complete Molecular Response) definierades som utrotning av befintliga molekylära abnormiteter och Partiell molekylär respons (Partial Molecular Response) som en minskning av belastningen av *JAK2 V617F*-mutantallel på ≥ 50 % (endast tillämpningsbart för patienter med en belastning av *JAK2 V617F*-mutantallel vid baslinjen på minst 20 %) (10,11).

Sedan 2006 finns det flera metoder som huvudsakligen är baserade på PCR-teknik eller sekvensering för att detektera förekomst och eventuellt även kvantifiera *JAK2 V617F* med hjälp av laboratorieutvecklade tester. De här testerna har olika analytisk prestanda, framför allt avseende precision och känslighetsnivå. Denna skillnad kan ha betydelse för behovet av benmärgsanalys, tiden som krävs för att fastställa en slutgiltig diagnos och eventuellt även den diagnostiska prestandan och funktionerna för att övervaka molekylära sjukdomar.

I och med de breda intervallen av potentiella, mutanta *JAK2 V617F*-allelfraktioner som ofta förekommer vid MPN-tillstånd (på nivåer på så lite som 1 %) är det rekommenderat att laboratorierna utför testning av JAK2 V617F-mutationer med hög analytisk känslighet. Använd tekniker som har en låg detektionsgräns (minst 1 % för diagnos och minst 0,1 % för övervakning av molekylära sjukdomar) och hög reproducerbarhet (5,13).

Testprincipen

Flera olika typer av teknik har föreslagits för kvantitativ bestämning av andelen enkelnukleotidpolymorfismer (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) i DNA-prover. Vissa typer, till exempel smältkurvor och sekvensering, är endast semikvantitativa. Metoder som baseras på kvantitativ real-time polymeraskedjereaktion (qPCR) är att föredra på grund av deras högre känslighet. Användning av en SNP-specifik primer tillåter selektiv amplifiering av mutant (MT)- eller vildtyp (WT)-allelen som enkelt kan detekteras med hjälp av ett instrument för real-time qPCR. Detta möjliggör en känslighet på < 0,1 %, vilket är i linje med det för närvarande accepterade cut-off-värdet för JAK2 på 1 % som används för klinisk positivitet för diagnostik och den rekommenderade detektionsgränsen för *JAK2 V617F* allelbelastning på ≤ 0,1 % för övervakning av molekylära sjukdomar (5,13). Det ska dock påpekas att vissa kliniska experter betraktar all *JAK2 V617F*-förekomst som kliniskt signifikant när diagnosering och att det därför finns behov av en känsliga metoder som qPCR (14). *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit är baserat på denna teknik.

Användning av qPCR möjliggör korrekt kvantifiering av PCR-produkter under den exponentiella fasen av PCR-amplifieringsprocessen. Kvantitativa PCR-data kan erhållas snabbt, utan bearbetning post-PCR, genom realtidsdetektion av fluorescenssignaler under och/eller efter PCR-cykling, vilket därmed avsevärt minskar risken för PCR-kontaminering. För närvarande finns 3 tillgängliga huvudtyper av qPCR-teknik: qPCR-analys med SYBR® Green I-färg, qPCR-analys med hydrolyssökfragment och qPCR-analys med hybridiseringssökfragment.

I QIAGEN-analysen används principen qPCR-oligonukleotidhydrolys. Under PCR hybridiserar framåt och omvända primrar till en specifik sekvens. En annan färgbunden oligonukleotid ingår i samma mix. Det här sökfragmentet, som består av en oligonukleotid märkt med en 5'-reporterfärg och en nedströms 3'-quencher utan färg, hybridiserar till en målsekvens inom PCR-produkten. qPCR-analysen med hydrolyssökfragment utnyttjar 5'→3'-exonukleas-aktiviteten i *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA-polymeraset. När sökfragmentet är intakt fluorescerar inte reporterfärgen så länge reportern och quenchern är i närheten av varandra, vilket främst uppnås genom energiöverföring av Förster-typ.

Om målobjektet är närvarande under PCR binder både framåt och omvända primrar specifikt till sökfragmentet och flankerar den. 5'→3'-exonukleas-aktiviteten i DNA-polymeraset klyver bara sökfragmentet mellan reportern och quenchern om de tre oligonukleotiderna hybridiserar till målet. Sökfragmenten förskjuts från målet och polymeriseringen av strängen fortsätter. Sökfragmentets 3'-ände blockeras för att förhindra att sökfragmentet förlängs under PCR (bild 1). Den här processen uppstår i varje cykel och interfererar inte med den exponentiella ackumuleringen av produkten.

Ökningen av fluorescenssignalen detekteras bara om målsekvensen är komplementär till primrarna och sökfragmenten och därför amplifieras under PCR. På grund av de här tre kraven detekteras inte icke-specifik amplifiering. Sålunda är ökningen av fluorescensen direkt proportionell mot målamplifieringen under PCR.

In qPCR, kallas antalet PCR-cykler som behövs för att detektera en signal ovanför tröskeln för korspunkt (Crossing Point, CP) eller cykeltröskelvärde (Cycle Threshold, CT), och är direkt proportionell till mängden mål som finns i början av reaktionen.

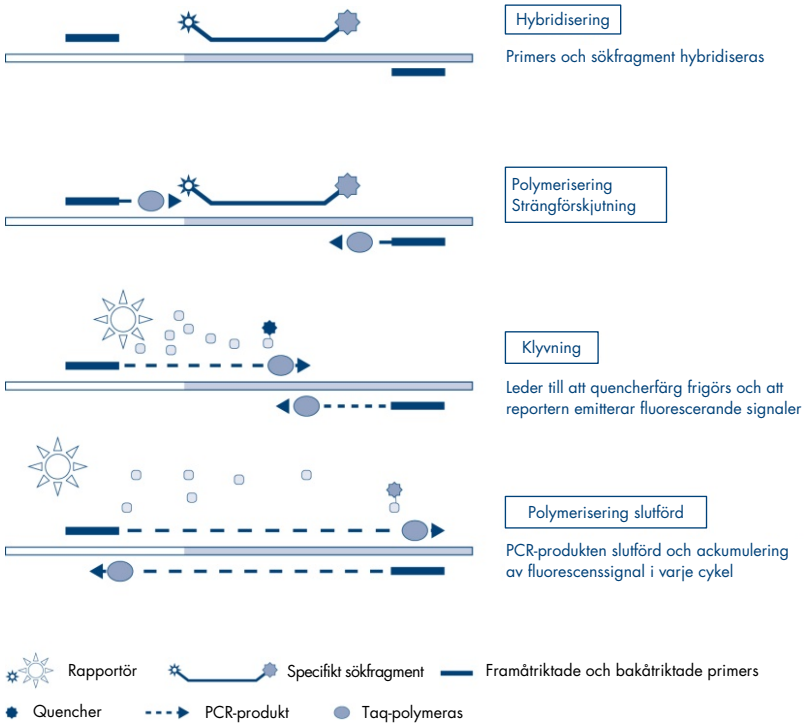

Bild 1. Reaktionsprincip. Den kvantitativa allelspecifika PCR-tekniken som används i det här analyskitet möjliggör sensitiv och korrekt detektion av SNP med hög reproducerbarhet. Den här tekniken baseras på användning av specifika omvända primrar för vildtyp- respektive V617F-allelen (15). Endast en perfekt matchning mellan primer och mål-DNA möjliggör förlängning och amplifiering vid PCR-reaktion (bild 2).

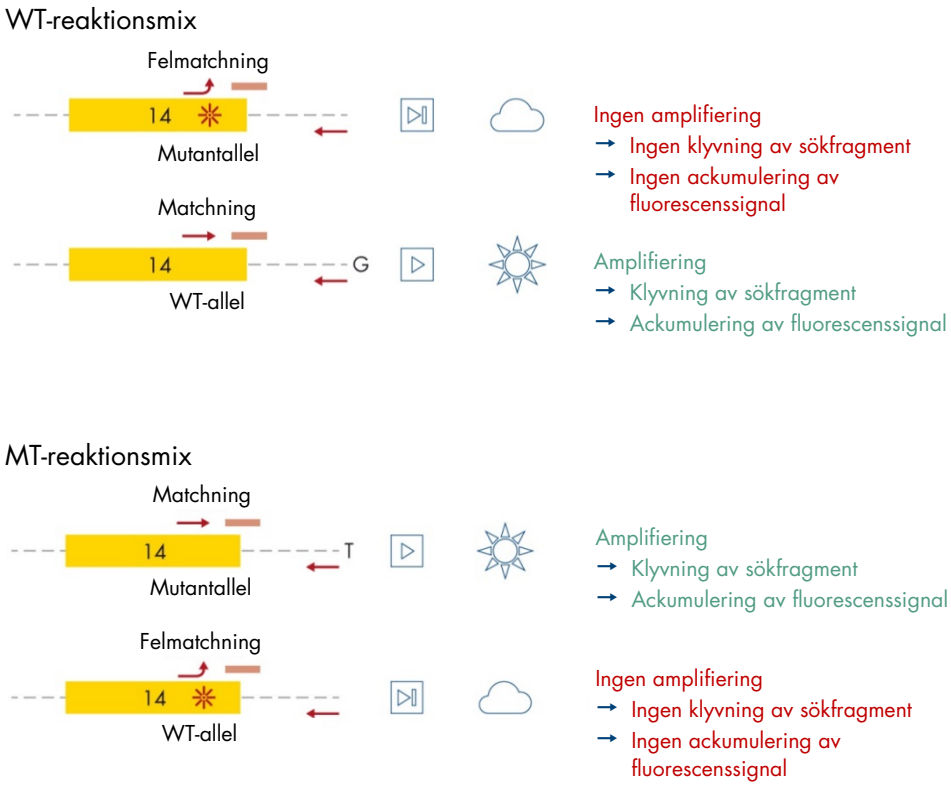

Bild 2. Allelspecifik PCR. Användning av vildtyp- eller V617F-primrar och sökfragmentblandning möjliggör specifik detektion av vildtyp- eller muterad allel i två separata reaktioner som genomförs med samma prov. Resultaten kan uttryckas som procentandelen mutantkopior av det totala antalet JAK2-kopior. MT: mutant, WT: vildtyp.

Material som medföljer

Kitinnehåll

***ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit**	**24**
Katalognr.	**674623**

Färg	Identitet	Rör-ID	Volym
Röd	JAK2 Mutant Control (JAK2-mutantkontroll, 100 % V617F-allel)	MT Ctrl	33 µL
Grön	JAK2 WT Control (JAK2 WT-kontroll, 100 % vildtypallel)	WT Ctrl	33 µL
Röd	JAK2 MT Quant Standard 1 (JAK2 MT Quant-standard 1) (5×10^1 V617F-kopior/5 µL)	MT QS1	20 µL
Röd	JAK2 MT Quant Standard 2 (JAK2 MT Quant-standard 2) (5×10^2 V617F-kopior/5 µL)	MT QS2	20 µL
Röd	JAK2 MT Quant Standard 3 (JAK2 MT Quant-standard 3) (5×10^3 V617F-kopior/5 µL)	MT QS3	20 µL
Röd	JAK2 MT Quant Standard 4 (JAK2 MT Quant-standard 4) (5×10^4 V617F-kopior/5 µL)	MT QS4	20 µL
Grön	JAK2 WT Quant Standard 1 (JAK2 WT Quant-standard 1) (5×10^1 vildtypkopior/5 µL)	WT QS1	20 µL
Grön	JAK2 WT Quant Standard 2 (JAK2 WT Quant-standard 2) (5×10^2 vildtypkopior/5 µL)	WT QS2	20 µL
Grön	JAK2 WT Quant Standard 3 (JAK2 WT Quant-standard 3) (5×10^3 vildtypkopior/5 µL)	WT QS3	20 µL

Kitets innehåll (forts.)

***ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit**	**24**
Katalognr	**674623**

Färg	Identitet	Rör-ID	Volym
Grön	JAK2 WT Quant Standard 4 (JAK2 WT Quant-standard 4) (5 x 10^4 vildtypkopior/5 µL)	WT QS4	20 µL
Röd	JAK2 MT Reaction Mix (JAK2 MT-reaktionsmix)	MT Mix	1010 µL
Grön	JAK2 WT Reaction Mix (JAK2 WT-reaktionsmix)	WT Mix	1010 µL
Mint	Taq DNA polymerase (Taq DNA-polymeras, HotStarTaq® 5 enheter/µL)	Taq	85 µL
Vit	TE buffer for sample dilution (TE-buffert för spädning av prov)	TE	1,9 ml
Vit	Water for no template control (NTC) (vatten för kontroll utan mall (NTC))	NTC	1,9 ml
ipsogen *Hanbok för JAK2 RGQ PCR Kit* (engelska)			1

Paketets innehåll

De viktigaste komponenterna i kitet förklaras nedan.

Tabell 2. Reagenser som medföljer

Reagens	Aktiva innehållsämnen	Volym
JAK2 Mutant Control (JAK2-mutantkontroll)	Cellinje-DNA med 100 % V617F-allel	33 µL
JAK2 WT Control (JAK2 WT-kontroll)	Cellinje-DNA med 100 % vildtyp-allel	33 µL
JAK2 MT Quant-standarder (QS1 till QS4)	Plasma med V617F-allelsekvensen	20 µL vardera
JAK2 MT Quant Standards (JAK2 WT Quant-standarder) (QS1 till QS4)	Plasma med WT-allelsekvensen	20 µL vardera
JAK2 MT Reaction Mix (JAK2 MT-reaktionsmix)	Oligonukleotider vid detektering av MT-allelen och intern kontroll, PCR-buffert, $MgCl_2$, dNTP:er	1010 µL
JAK2 WT Reaction Mix (JAK2 WT-reaktionsmix)	Oligonukleotider vid detektering av WT-allelen och intern kontroll, PCR-buffert, $MgCl_2$, dNTP:er	1010 µL
Taq DNA polymerase (Taq DNA-polymeras)	Varmstart med Taq DNA-polymeras i förvaringsbuffert	85 µL
TE buffer for sample dilution (TE-buffert för spädning av prov)	Tris-EDTA-buffertlösning	1,9 ml
Water for no template control (NTC) (vatten för kontroll utan mall (NTC))	Nukleasfritt vatten	1,9 ml

Reagenser

De reagenser som medföljer (se tabell 2 ovan) krävs för att späda ut testproverna till önskad inmatning och för att utföra qPCR-reaktioner vid detektering och kvantifiering av *JAK2*-mutanter och vildtypsalleler för att avgöra mutationsprocenten. Internamplifieringskontrollen som medföljer reaktionsmixarna används för att övervaka qPCR-hämning och utesluta misslyckade PCR-reaktioner vid eventuella negativa resultat.

Kontroller och standarder

Kitet innehåller två kontroller: en JAK2-mutantkontroll som används för positiv kontroll i JAK2 Mutant (MT)-reaktionsmixen och en JAK2-vildtypskontroll (WT) för positiv kontroll i reaktionsmix för JAK2-vildtypskontroll. Nukleasfritt vatten används för båda reaktionsmixarna för att utföra kontroller utan mall.

Kitet innehåller fyra JAK2 Mutant (MT)-kvantifieringsstandarder (QS, Quantitation Standards) och fyra JAK2-vildtypskvantifieringsstandarder (WT). Använd dessa för att beräkna antal JAK2 MT- och WT-kopior och därmed beräkna *JAK2 V617F*-mutationsprocenten för testproverna.

Material som behövs men inte medföljer

Förbrukningsartiklar och reagenser för manuell DNA-extraktion

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104)
- Etanol (96–100 %)
- **Obs!** Använd inte denaturerad alkohol eftersom den innehåller andra substanser såsom metanol eller metyletylketon.

Förbrukningsartiklar och reagenser för automatisk DNA-extraktion

- QIAsymphony® DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (kat.nr 997002)
- 8-Rod Covers (kat.nr 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (kat.nr 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (kat.nr 990332)
- Elution Microtubes CL (kat.nr 19588)
- Tip disposal bags (kat.nr 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (Sarstedt®, kat.nr 72.694, **www.sarstedt.com**)

Förbrukningsartiklar och reagenser för PCR

- Nukleasfria aerosolresistenta sterila PCR-pipettspetsar med hydrofobiskt filter
- 1,5 mL eller 2,0 mL nukleasfria PCR-rör
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml för Rotor-Gene Q (kat.nr 981103 eller 981106)
- Is

Utrustning

- Justerbara pipetter* avsedda för PCR (1–10 µL;_10–100 µL; 100–1 000 µL)
- Engångshandskar
- Vortexblandare
- Värmeblock för lysering av prover vid 56 °C
- Bänkcentrifug* med rotor för 0,5/1,5/2,0 mL reaktionsrör (med kapacitet för 13 000–14 000 rpm)
- Spektrofotometer*

Provberedningsutrustning

- Instrumentet QIAsymphony SP*(kat.nr 9001297), programversion 4.0 eller senare, medföljande tillbehör samt protokollet Blood_200_V7_DSP (eller senare version)
- Tube Insert 3B (För in 2,0 mL v2, provcarrier (provcarr.) (24), Qsym, kat.nr 9242083)

Utrustning för real-time PCR

- Real-time PCR-instrument*: Systemet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (kat.nr 9002032) eller Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (kat.nr 9002033) samt medföljande tillbehör
- Installerad Rotor-Gene AssayManager® version 2.1.x (x≥0)
- Installerade Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in version 1.0.x (x ≥ 0)
- Importerad ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR analysprofil (AP_ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR_V2_0_x.iap (x≥1))

* Säkerställ att instrumenten är kontrollerade och kalibrerade enligt tillverkarens rekommendationer före användning.

Varningar och försiktighetsåtgärder

Var medveten om att du kan behöva konsultera lokala regelverk för rapportering av allvarliga incidenter som inträffat i samband med enheten till tillverkaren och/eller auktoriserad representant och den tillsynsmyndighet där användaren och/eller patienten befinner sig.

Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheet, SDS). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen **www.qiagen.com/safety**, där du kan hitta, visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

- Prover är potentiellt smittsamma. Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.

IAKTTAG FÖRSIKTIGHET	Tillsätt ALDRIG blekmedel eller sura lösningar direkt till provet eller provavfallet.

Vid nödsituationer

CHEMTREC
Utanför USA och Kanada +1 703 527 3887

Försiktighetsåtgärder

Användning av qPCR-tester kräver god laboratoriesed, inklusive underhåll av utrustning, som är speciellt anpassad till molekylärbiologi och som uppfyller tillämpliga regler och relevanta standarder.

Det här kitet är avsett för in vitro-diagnostisk användning. Reagenserna och instruktionerna som medföljer detta kit har validerats för optimal prestanda.

- Testet är avsett för användning med helblodsprover som har antikoagulerats med kalium-EDTA (K_2-EDTA) och förvarats i 2 °C till 8 °C i maximalt 96 timmar innan DNA-extraktion.
- Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. Prover är potentiellt smittsamma och måste hanteras som smittfarligt material.
- Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.
- Reagenser till *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit är optimalt utspädda. Späd inte ut reagenserna ytterligare då det kan resultera i förlorad prestanda.
- Använd inte reaktionsvolymer (reaktionsmix plus prov) på mindre än 25 µL.
- Alla reagenser som medföljer *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma kit. Byt inte ut något reagens från ett kit mot samma reagens från ett annat *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (även om det kommer från samma batch), eftersom detta kan påverka prestandan.
- Ytterligare information om varningar, försiktighetsåtgärder och procedurer finns i användarhandböckerna för Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet, Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application, Gamma Plug-in och användarhandboken för QIAsymphony SP-instrumentet.
- Ändring av inkubationstider och temperaturer kan orsaka felaktiga eller icke överensstämmande data.
- Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Reaktionsmixar kan ändras om de utsätts för ljus.

- Iaktta största försiktighet för att förhindra att mixarna kontamineras av syntetiskt kontrollmaterial som finns i reagenserna JAK2 MT och JAK2 WT Quant Standard samt i kontrollreagenserna JAK2 Mutant och JAK2 WT.
- Iaktta största försiktighet för att undvika överföring av smitta via carry-over av DNA- eller PCR-produkter, vilket kan orsaka en falskt positiv signal.
- Iaktta största försiktighet för att förhindra kontaminering av DNase, vilket kan orsaka försämring av mall-DNA.
- Använd separata för ändamålet avsedda pipetter för iordningställande av reaktionsmixar och tillsats av mall.
- Öppna inte Rotor-Gene Q MDx-instrumentet förrän körningen har avslutats.
- Öppna inte Rotor-Gene Q-rören när körningen har avslutats.
- Iaktta största noggrannhet med betoning på felaktig provinmatning, laddningsfel och pipetteringsfel för att säkerställa korrekt provtestning.
- Se till att proverna hanteras på ett systematiskt sätt för att säkerställa att identifieringen alltid blir korrekt så att proverna går att spåra.
- Vi rekommenderar följande hantering:

    - Använd nukleasfritt laboratoriematerial (t.ex. pipetter, pipettspetsar, reaktionsflaskor) och bär handskar när du utför analysen.
    - Använd nya aerosolresistanta pipettspetsar för alla pipetteringssteg för att undvika korskontaminering av prover och reagenser.
    - Bered för-PCR-masterblandning med därför avsedda tillbehör (pipetter, spetsar etc.) i ett anpassat utrymme där inget DNA-material (DNA, plasmid eller PCR-produkter) förs in. Tillsätt mall i ett separat utrymme (helst i ett annat rum) med hjälp av specialanpassat material (pipetter, spetsar, osv.).

Säkerhetsinformation relaterat till extraktionskiten QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) och QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) finns i handböckerna till respektive kit.

Förvaring och hantering av reagenser

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

Leveransvillkor

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit levereras på torris. Om någon komponent i *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (förutom enzym) inte är frusen vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bipacksedel, handbok eller reagenser i leveransen ska du kontakta någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök **www.qiagen.com**).

Förvaringsförhållanden

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit måste omedelbart förvaras i -30 till -15 °C i en frys med konstant temperatur och skyddat mot ljus.

Information om förvaring relaterat till extraktionskiten QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) och QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) finns i handböckerna till respektive kit.

Användningsstabilitet

Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren är *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit hållbart fram till det utgångsdatum som anges på förpackningens etikett.

När reagenser har öppnats kan de förvaras i originalförpackningen vid -30 till -15° C i upp till 12 månader. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Överskrid inte maximalt fem frys-/upptiningscykler.

Information om stabilitet relaterat till extraktionskiten QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) och QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) finns i handböckerna till respektive kit.

- Blanda försiktigt genom att vända röret 10 gånger och centrifugera alla rör utom enzymet innan de öppnas.
- Utgångsdatum för reagenserna anges på etiketterna till varje enskild produkt. Under korrekta förvaringsvillkor behåller produkten sin prestanda under hela stabilitetstiden som anges på röret och förpackningsetiketten.
- **Obs!** Se till att inte blanda innehåll från olika rörbatchar. De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-komponenter som används för testet måste tillhöra samma batch. Vid kvalitetskontrollerna hos QIAGEN testas varje individuell lot i den funktionella satsen innan den levereras. Blanda därför inte reagenser från olika kit även om de kommer från samma lot.

Förvaring och hantering av prover

Helblodsprover

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit är avsett för användning med genomiska DNA-prover som extraherats från helblodsprover som har antikoagulerats med kalium-EDTA (K_2-EDTA) och förvarats på något av följande sätt:

- I 2–8 °C i högst 96 timmar
- I 15–25 °C i högst 96 timmar
- Fruset i -30 till -15 °C i högst 1 månad

Obs! Se till att hålla en jämn temperatur under förvaring vid insamlingsplatsen och vid transport. Transporttemperaturen måste vara lika som förvaringsförhållandena på testplatsen eller lägre.

Alla prover ska betraktas som potentiellt smittsamma. Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.

Prover med genomiskt DNA

När det genomiska DNA:t har extraherats kan DNA-proverna förvaras och transporteras i temperaturer på -30 till -15 °C i upp till 24 månader. Undvik frysning och upptining. Överskrid inte antalet tillåtna frysnings-/upptiningscykler.

Protokoll: Extraktion och beredning av genomiskt DNA från helblod

Viktigt att tänka på före start

- Genomiskt DNA ska erhållas med hjälp av antingen QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) eller QIAsymphony SP-instrumentet i kombination med QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236).
- Kontrollera att reagenserna som ska användas inte har passerat utgångsdatum och att de har transporterats och förvarats under rätt förhållanden.
- **Obs!** *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit är endast validerat för användning i kombination med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) eller QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236). Använd inte någon annan produkt för DNA-extraktion.

Manuell extraktion av genomiskt DNA med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Manuell extraktion av genomiskt DNA måste utföras med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) enligt motsvarande *Handbok för QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit*.

Hantering av reagenser

- Vid förberedning av tvättbuffertar för det här protokollet måste du blanda den rekonstituerade tvättbufferten blandas före proceduren genom att vända på flaskan ett par gånger.
- Använd pipettspetsarna med aerosolbarriärer för att pipettera elueringsbufferten från flaskan och sätt på locket omedelbart för att undvika kontaminering.
- Iaktta extra försiktighet vid hantering av viskösa vätskor och använd lämplig pipett för att fördela korrekta volymer.
- Undvik att vidröra membranet på QIAamp Mini spin-kolumnen med pipettspetsen.

- Tillsätt inte QIAGEN Protease (QP) direkt i lyseringsbufferten (AL).

Saker som måste göras före start

- Ekvilibrera blodproverna till rumstemperatur (15–25 °C) och säkerställ att de har homogeniserats ordentligt.
- Bereda lyseringsbufferten
  Om det har bildats precipitat i lyseringsbufferten (AL) löser du upp den genom att inkubera i 56 °C.
- Bereda QIAGEN Protease
  Tillsätt 1,2 mL proteaslösningsmedel (PS) i flaskan med lyofiliserat QIAGEN Protease (QP) och blanda försiktigt. Blanda genom att vända flaskan flera gånger för att undvika skumbildning. Se till att QIAGEN Protease (QP) är fullständigt upplöst.
  Obs! Tillsätt inte QP direkt i lyseringsbufferten (AL).
- Bereda tvättbuffert 1
  Mät upp 25 mL etanol (96–100 %) med en mätcylinder och tillsätt det i flaskan som innehåller 19 mL koncentrat av tvättbuffert 1 (AW1). Förvara rekonstituerad tvättbuffert 1 (AW1) i rumstemperatur (15–25 °C).
  Obs! Blanda alltid rekonstituerad tvättbuffert 1 (AW1) genom att vända flaskan flera gånger innan proceduren startas.
- Bereda tvättbuffert 2
  Mät upp 30 mL etanol (96–100 %) med en mätcylinder och tillsätt det i flaskan som innehåller 13 mL koncentrat av tvättbuffert 2 (AW2). Förvara rekonstituerad tvättbuffert 2 (AW2) i rumstemperatur (15–25 °C).
  Obs! Blanda alltid rekonstituerad tvättbuffert 2 (AW2) genom att vända flaskan flera gånger innan proceduren startas.
- Bereda elueringsbufferten
  En flaska elueringsbuffert (AE) ingår i kitet. Det rekommenderas att pipettspetsar med aerosolbarriärer används när elueringsbuffert (AE) pipetteras från flaskan och att locket på flaskan omedelbart sätts på igen för att undvika kontamination.
- Ekvilibrera elueringsbufferten (AE) till rumstemperatur (15–25 °C).
- Ställ in ett värmeblock på 56 °C för användning i steg 4 i proceduren.

Procedur

1. Pipettera 20 µL QIAGEN Protease (QP) i ett lyseringsrör (LT).

   Obs! Kontrollera utgångsdatumet för det rekonstituerade proteaset före användning.
2. Tillsätt 200 µL blodprov till lyseringsröret (LT).
3. Tillsätt 200 µL lyseringsbuffert (AL) i lyseringsröret (LT), sätt på korken och blanda genom att vortexblanda i pulser i 15 sekunder.

   Obs! För att säkerställa lysering måste provet och lyseringsbuffert (AL) blandas noga för att lösningen ska bli homogen.

   Obs! Eftersom lyseringsbuffert (AL) har hög viskositet måste du kontrollera att rätt volym tillsätts i lyseringsbuffert (AL) genom att pipettera mycket noga med en lämplig pipett.

   Tillsätt inte QIAGEN Protease (QP) direkt i lyseringsbuffert (AL).
4. Inkubera i 56 °C (± 1 °C) i 10 minuter (± 1 minut).
5. Centrifugera lyseringsröret (LT) i ungefär 5 sekunder vid full hastighet för att få bort droppar från insidan av korken.
6. Tillsätt 200 µL etanol (96–100 %) i lyseringsröret (LT), sätt på korken och blanda noga genom att vortexa i pulser i ≥ 15 sekunder.
7. Centrifugera lyseringsröret (LT) i ≥ 5 sekunder vid full hastighet för att få bort eventuella vätskedroppar från insidan av korken.
8. Applicera hela lysatet från steg 7 försiktigt i QIAamp Mini spin-kolumnen utan att blöta ned kanten. Undvik att vidröra membranet på QIAamp Mini spin-kolumnen med pipettspetsen.

   Obs! Om flera prov bearbetas ska endast ett lyseringsrör (LT) öppnas åt gången.
9. Stäng locket på QIAamp Mini spin-kolumnen och centrifugera vid cirka 6 000 x *g* i 1 minut. Placera QIAamp Mini spin-kolumnen i ett rent tvättrör (WT) och kasta röret med filtratet.

Obs! Om lysatet inte har passerat genom membranet fullständigt efter centrifugering i 6 000 × *g* (8 000 rpm) centrifugerar du igen i full hastighet (upp till 20 800 × *g*) i 1 minut.

Obs! Om lysatet fortfarande inte passerar genom membranet under centrifugeringen kasserar du provet och upprepar isoleringen och reningen med nytt provmaterial.

10. Öppna QIAamp Mini spin-kolumnen försiktigt och tillsätt 500 µl tvättbuffert 1 (AW1) utan att blöta ned kanten. Undvik att vidröra membranet på QIAamp Mini spin-kolumnen med pipettspetsen.
11. Stäng locket till QIAamp Mini spin-kolumnen och centrifugera i ca 6 000 × *g* (8 000 rpm) i 1 minut. Placera QIAamp Mini spin-kolumnen i ett rent tvättrör (WT) och kasta röret med filtratet.
12. Öppna QIAamp Mini spin-kolumnen försiktigt och tillsätt 500 µl tvättbuffert 2 (AW2) utan att blöta ned kanten. Undvik att vidröra membranet på QIAamp Mini spin-kolumnen med pipettspetsen.
13. Stäng locket till QIAamp Mini spin-kolumnen och centrifugera i full hastighet (ca 20 000 × *g* eller 14 000 rpm) i 1 minut. Placera QIAamp Mini spin-kolumnen i ett rent tvättrör (WT) och kasta röret med filtratet.
14. Centrifugera i full hastighet (ca 20 000 × *g* eller 14 000 rpm) i 3 minuter för att torka membranet helt.
15. Placera QIAamp Mini spin-kolumnen i ett rent elueringsrör (ET) och kasta tvättröret (WT) med filtratet. Öppna locket till QIAamp Mini spin-kolumnen försiktigt och tillsätt 50 till 200 µL elueringsbuffert (AE) i mitten av membranet. Stäng locket och inkubera vid rumstemperatur (15–25 °C) i 1 minut. Centrifugera i ca 6 000 × *g* (8 000 rpm) i 1 minut för att eluera DNA:t.
16. Kassera använda provrör, plattor och avfall i enlighet med lokala säkerhetsregler.

Automatisk extraktion av genomiskt DNA med QIAsymphony DSP DNA Mini Kit

Automatisk extraktion av genomiskt DNA måste utföras med instrumentet QIAsymphony och provberedningsmodulen (SP, Sample Preparation) i kombination med QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) och genom att följa instruktionerna i *Handbok för QIAsymphony DSP DNA Kit*. De specifika protokollegenskaper som ska användas med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit är markerade med tecknet ⚠ i nedanstående procedur.

Tillsammans med QIAsymphony SP möjliggör QIAsymphony DSP DNA Mini Kit automatisk DNA-rening från humant helblod (genom att använda protokollet Blood_200_V7_DSP (eller senare version) på QIAsymphony SP).

- Ingen förbehandling krävs.
- Rören överförs direkt till QIAsymphony SP.
- Rening av DNA utförs med magnetiska partiklar.

Viktigt att tänka på före start

- ⚠ Den helblodsvolym som ska extraheras är 300 µL.

Förberedelser

- Se till att du känner till hur QIAsymphony SP används. Driftsanvisningar finns i de användarhandböcker som medföljer instrumentet.

Hantering av reagenser

- Innan du använder reagenskassetten för första gången kontrollerar du att Buffer QSL1 och Buffer QSB1 inte innehåller precipitat. Vid behov avlägsnar du de tråg som innehåller Buffer QSL1 och Buffer QSB1 från reagenskassetten, inkuberar dem i 30 minuter vid 37 °C och skakar om då och då för att lösa upp precipitat. Sätt tillbaka trågen på rätt plats. Om reagenskassetten redan är perforerad ska du försluta trågen med återanvändbara tätningsremsor, och därefter inkuberar du hela reagenskassetten i 30 minuter i 37 °C i vattenbad och skakar då och då.
- Försök att undvika kraftiga omskakningar av reagenskassetten (Reagent Cartridge, RC) eftersom det då kan bildas skum, vilket kan göra det svårt att fastställa vätskenivån.

Underhåll

- Underhåll av QIAsymphony SP är valfritt, men rekommenderas starkt för att undvika risk för kontaminering.

Saker som måste göras före start

- Innan du startar förfarandet, måste du kontrollera att magnetpartiklarna är helt återsuspenderade. Vortexblanda tråget som innehåller de magnetiska partiklarna kraftfullt i minst 3 minuter före första användningen.
- Se till att instickslocket placeras på reagenskassetten och att locket till tråget med de magnetiska partiklarna har tagits bort eller, om du använder en delvis använd reagenskassett och kontrollera att de återanvändbara tätningsremsorna är borttagna.
- Se till att enzymrören är öppna.
- Om proverna är streckkodade ska du placera proven i rörhållaren så att streckkoderna pekar mot streckkodsläsaren på vänster sida av QIAsymphony SP.

Procedur

1. Stäng alla lådor och huven.
2. Sätt på QIAsymphony SP och vänta tills skärmen ”Sample Preparation” (provberedning) visas och initieringen har slutförts.

   Obs! Strömbrytaren sitter vid det nedre vänstra hörnet av QIAsymphony SP.
3. Logga in på instrumentet.
4. Kontrollera att lådan ”Waste” (avfall) är korrekt förberedd – gör en inventering och kontrollera att t.ex. spetsnedkastet och behållaren för vätskeavfall är på plats. Byt ut avfallspåsen för spetsar vid behov.
5. Sätt in det aktuella elueringsracket i lådan ”Eluate” (Eluat).

   Viktigt: Ladda inte en platta med 96 brunnar på ”Elution slot 4”.

   Använd endast ”Elution slot 1” (Elueringsskåra 1) med motsvarande avkylningsadapter.

   Obs! Om du använder en platta med 96 brunnar, kontrollerar du att plattan har rätt riktning eftersom en felaktig placering kan göra att proverna blandas ihop vid nedströmsanalys.
6. Sätt in de aktuella reagenskassetterna och förbrukningsmaterialen i lådan ”Reagents and Consumables” (Förbrukningsartiklar och reagenser).

   Obs! Kontrollera att pipetteringsspetsarna är korrekt fixerade.
7. Gör en inventering av lådan ”Reagents and Consumables” (Förbrukningsartiklar och reagenser).
8. Överför **300 µL** av det helblodsprov som ska extraheras till ett nukleasfritt Micro tube (2,0 mL typ H) och placera röret i 3b 2 ml-adaptern i provrörsstället. Sätt in provrören i lådan ”Sample” (Prov).
9. Använd sedan pekskärmen och ange den information som krävs för varje batch med prover som ska bearbetas:

- **Provinformation**: Ändra format på standardröret. Klicka på **Select All** (Välj alla) för att göra detta. Välj sedan **Sarstedt-referens 72.694** i bladet **Tube Insert**.
- **Protokoll som ska köras**: Klicka på **Select All** (Välj alla). I kategorin klickar du sedan på **DNA Blood** > **Blood_200_V7_DSP** (eller senare version) för helblodsprov.
- **Elueringsvolym och output-position**: 100 µL för helblodsprotokollet.
  Obs! När du har angett batchinformationen ändras statusen från **LOADED** (Laddad) till **QUEUED** (Köad). När en batch har köats aktiveras knappen **Run** (Kör).

10. Starta körningen.

    10a. Klicka på **Run** (Kör) för att starta körningen.

    10b. Läs meddelandet som visas och bekräfta det.

    Obs! Vi rekommenderar att du väntar bredvid instrumentet tills det har utfört detektion av vätskenivån i internkontrollrören och att statusen för QIAsymphony SP-stället ändras till **RUNNING** (Körning pågår).

    Viktigt: Pausa eller avbryt inte körningen när bearbetning pågår (såvida det inte inträffar en olycka) eftersom det gör att proverna kommer att flaggas som "unclear" (ej tydligt).

    Obs! Det går att ladda prover kontinuerligt och lägga till dem i körningen (tills det att reagenserna laddas).
11. Klicka på **Run** (Kör) för att starta reningen.
12. I slutet av protokollet för körningen ändras statusen för batchen från **RUNNING** (Körning pågår) till **COMPLETED** (Slutförd). Ta ut elueringsracket med de renade nukleinsyrorna från lådan "Eluate" (Eluat).

    Vi rekommenderar att du tar ut eluatplattan från lådan "Eluate" (Eluat) omedelbart efter att körningen är slutförd. Beroende på temperatur och fuktighet kan elueringsplattor som lämnas kvar i QIAsymphony SP efter det att körningen har slutförts kondensera eller avdunsta.

    Obs! I allmänhet överförs inte de magnetiska partiklarna till eluaten. Om du ser svarta partiklar i ett eluat kan dessa magnetiska partiklar tas bort på följande sätt:

    12a. Sätt in röret med DNA:t i en lämplig magnetisk separator (t.ex. QIAGEN 12-Tube Magnet, kat.nr 36912) tills de magnetiska partiklarna har separerats.

12b. Om DNA finns på mikroplattor, låt mikroplattan genomgå en lämplig magnetseparator (t.ex. QIAGEN 96-Well Magnet Type A, kat.nr 36915) tills de magnetiska partiklarna har separerats. Om du inte har tillgång till en lämplig magnetisk separator centrifugerar du röret med DNA:t i 1 minut på full hastighet i en mikrocentrifug för att pelletera eventuella återstående magnetiska partiklar.

13. Exportera QIAsymphony SP-resultatfilen: den här rapporten genereras för varje elueringsplatta.

    13a. Sätt in USB-stickan i någon av USB-portarna på framsidan av QIAsymphony SP.

    13b. Klicka på **Tools** (Verktyg).

    13c. Välj **File Transfer** (Filöverföring).

    13d. På fliken In-/Output Files (Inkommande/utgående filer) klickar du på **Results Files** (Resultatfiler) > **Transfer** (Överför).
    Namnet på den exporterade filen måste ha följande format:
    åååå-mm-ddhh:mm:ss_Elueringsrack-ID

14. Kontrollera kolumnen "Validity of result" (giltighet för resultat) för varje prov i QIAsymphony SP-resultatfilen.
    - **Valid (giltig) och unclear (oklar) status**: Gå vidare till Kvalificering och kvantifiering av DNA.
    - **Invalid (ogiltig) status**: Provet avvisades. Upprepa extraktionssteget.

15. Om en reagenskassett endast har använts delvis ska du försegla den med medföljande tätningsremsor för återanvändning och stänga rören som innehåller proteinas K med skruvlock direkt efter slutförd protokollkörning för att undvika avdunstning.

16. Kassera använda provrör, plattor och avfall i enlighet med lokala säkerhetsregler.

17. Rengör QIAsymphony SP.

    Följ underhållsanvisningarna i användarhandböcker som medföljer instrumentet. Se till att du rengör spetsskydden regelbundet för att minimera risken för korskontaminering.

18. Stäng instrumentlådorna och stäng av QIAsymphony SP.

Kvalificering och kvantifiering av DNA

En blank med ATE- eller AE-buffert ska användas för att kalibrera spektrofotometern. De här buffertarna måste användas på grund av att de elueringsbuffertar som används i kiten för extraktion av genomiskt DNA innehåller konserveringsmedlet natriumazid, som absorberas vid 260 nm.

- A_{260}/A_{280}-kvoten måste vara ≥ 1,7 eftersom lägre kvoter vanligen indikerar proteinkontaminering eller förekomst av organiska kemikalier och påverkar PCR-steget.
- DNA-kvantiteten fastställs genom att mäta den optiska densiteten vid 260 nm.
- Den totala mängden renat DNA = koncentrationen x provets volym i µL.
- Om A_{260}/A_{280}-kvoten är under 1,7 och om koncentrationen av genomiskt DNA är under 10 ng/µL får bearbetningen av provet inte fortsätta.

Normalisering av prov med genomiskt DNA

DNA:t måste spädas till 10ng/µL i TE-bufferten som medföljer *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Varje PCR-reaktion i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM är optimerad för 50 ng renat genomiskt DNA spätt till en slutlig volym på 5 µL. Totalt 100 ng per testprov behövs för att utför mutant- och vildtypsreaktioner.

Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet

Viktigt att tänka på före start

- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit måste köras på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med Rotor-Gene AssayManager v. 2.1.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit kräver ett specifikt Gamma-plugin-program. Plugin-programmet hämtas från QIAGEN-webbplats på **resources.qiagen.com/674623**. Detta plugin-program måste installeras på en dator som redan har Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 installerat.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit behöver även en analysprofil. Den här analysprofilen (**.iap**-fil) innehåller alla parametrar som behövs för cykling och analysering av qPCR-analysen. Den går att hämta från webbplatsen relaterad till *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit på QIAGEN-webbplatsen: **resources.qiagen.com/674623.** Analysprofilen måste importeras till Rotor-Gene AssayManager v. 2.1-programmet.
- Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene Q MDx innan du startar protokollet. Detaljerad information finns i användarhandböckerna för instrumentet, Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 och Gamma-plugin-programmet.
- Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 möjliggör automatisk tolkning av PCR-resultaten. Cykelparametrarna är låsta för körningen.

Förberedelser

- Hämta och installera Rotor-Gene AssayManager v. 2.1. Mer information finns i "Installation av den grundläggande programvaran till Rotor-Gene AssayManager v. 2.1" på sidan 38.
- Ladda ned Gamma-plugin-programmet. Mer information finns i "Installation av Gamma-plugin-programmet och import av analysprofilen" på sidan 39.

- Vi rekommenderar testning av åtta prover med genomiskt DNA i samma analys för att optimera användningen av kontroller, standarder och reaktionsmixar. Mer information finns i "Provbearbetning på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72 rör" på sidan 42.

Installation av den grundläggande programvaran till Rotor-Gene AssayManager v. 2.1

Programvaran Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 måste installeras på datorn som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet och hämtas från QIAGEN-webbplatsen **resources.qiagen.com/674623**. Detaljerad information om installation av Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 finns i användarhandbok för *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Obs! *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit kan bara köras om vissa konfigurationsinställningar har gjorts i programvaran Rotor-Gene AssayManager v. 2.1.

För en systemomfattande processäkerhet måste följande obligatoriska konfigurationsinställningar anges för det stängda läget:

- Material number required (Materialnummer krävs)
- Valid expiry date required (Giltigt utgångsdatum krävs)
- Lot number required (Lotnummer krävs)

Installation av Gamma-plugin-programmet och import av analysprofilen

Installation och import av Gamma-plugin-programmet och analysprofilen beskrivs i användarhandboken för *Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 Core Application* och i användarhandboken för *Gamma Plug-In*-programmet.

Så här installerar du Gamma-plugin-programmet

19. Ladda ned både Gamma-plugin-programmet och den senaste versionen av *ipsogen* JAK2 CE IVDR-analysprofilen från QIAGEN-webbplatsen.
20. Dubbelklicka på msi-filen **RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_x** (där x är ≥0). Följ installationsanvisningarna.

    En utförlig beskrivning av den här processen finns i avsnittet om installation av plugin-program i användarhandboken för *Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 Core Application*.

    Obs! För en systemomfattande processäkerhet klickar du fliken Settings (Inställningar) och markerar kryssrutorna för **Material number required** (Materialnummer krävs), **Valid expiry date required** (Giltigt utgångsdatum krävs) och **Lot number required** (Lotnummer krävs) för det stängda läget (avsnittet Work list (Arbetslista)). Markera kryssrutorna om de inte redan är markerade.
21. När plugin-programmet har installerats måste en användare med administratörsbehörigheter för programvaran Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 importera analysprofilen ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR.

Så här importerar du analysprofilen ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR

1. Klicka på ikonen för for Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 för att öppna programvaran.
2. Logga in med administratörsbehörigheter i Closed (slutet) läge (bild 3).

Inloggningsfönstret öppnas (bild 4).

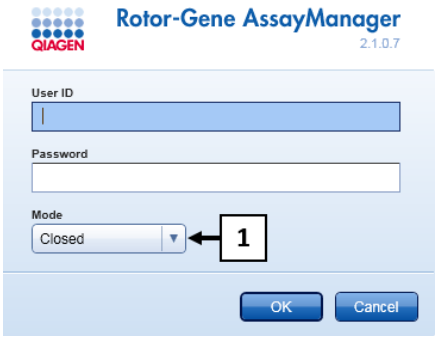

Bild 3. Inloggningsfönster för Rotor-Gene AssayManager. 1: Slutet läge.

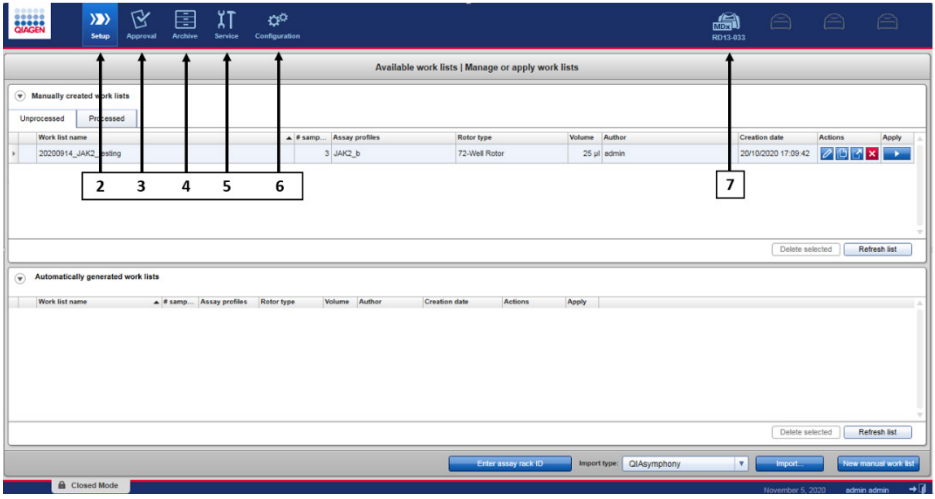

Bild 4. Rotor-Gene AssayManager v. 2.1. 2: Miljön Setup (Inställningar). Används för att skapa, hantera och applicera arbetslistor. 3: Miljön Approval (Godkännande). Används för att söka efter ej frigjorda eller delvis frigjorda experiment och för att godkänna dedikerade prover. Experimentrapporter skapas när ett prov frigörs. 4: Archive-miljö (arkiv). Används för att söka efter helt eller delvis frigjorda experiment och för att framställa experimentrapporter med användning av fördefinierade rapportprofiler. 5: Service-miljö (service). Innehåller fliken Audit Trail (Granskningsspår) Re-usable Data (Återanvändbar data). 6: Configuration (Konfiguration). Används för att justera inställningarna av Rotor-Gene AssayManager. 7: Rotor-Gene Q-ikonen. Används för att stoppa eller avsluta en körning och för att frigöra en termocykler när en körning är avslutad (och kontrollera instrumentanslutningen).

3. Klicka på miljön ”Configuration” (Konfiguration) (Bild 4, ruta 6) (Bild 5, ruta 8).
4. Klicka på fliken Assay Profiles (Analysprofiler) (Bild 5, ruta 9).
5. Klicka på **Import (Importera)** (Bild 5, ruta 10).
6. Välj analysprofilen ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR i dialogrutan Select assay profile to import (Välj den analysprofil som ska importeras). Klicka på **Open (Öppna)** (Bild 5, ruta 11).

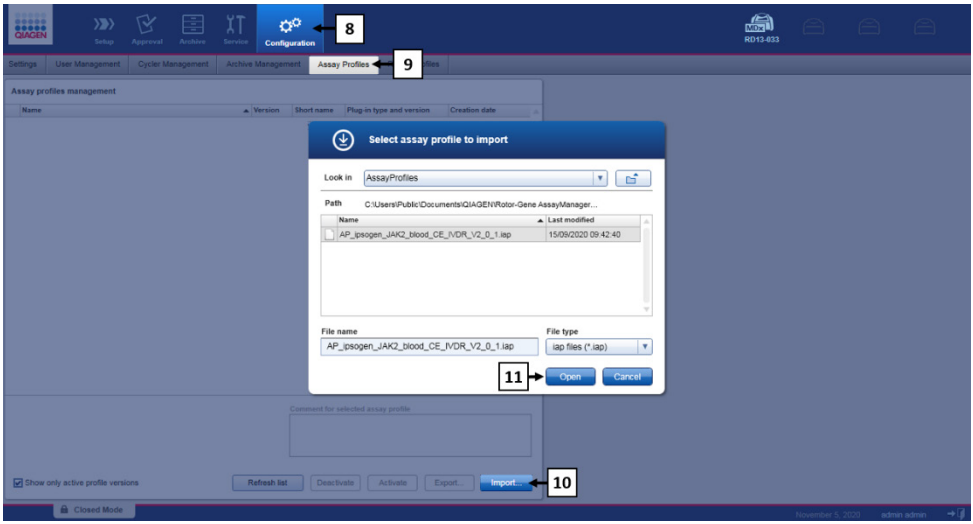

Bild 5. Import av analysprofiler. 8: Configuration-miljö (konfiguration), 9: Fliken Assay profile (Analysprofil), 10: Knappen Import (Importera), 11: Knappen Open (Öppna).

7. När analysprofilen har importerats kan den användas i miljön Setup (Inställningar) (Bild 4, ruta 2).

   Obs! Samma version av en analysprofil kan inte importeras två gånger.

Provbearbetning på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72 rör

Vi rekommenderar testning av åtta prover med genomiskt DNA i samma analys för att optimera användningen av kontroller, standarder och reaktionsmixar.

I tabell 3 anges antalet reaktioner som kan köras i rotorn med 72 rör.

I schemat nedan i bild 6 finns ett exempel på konfiguration av laddningsblock och rotor för ett experiment med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

Tabell 3. Antal reaktioner för Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72 rör

Prover	Antal reaktioner
Med JAK2 MT-reaktionsmix	
8 prover med genomiskt DNA	8
JAK2 MT Quant-standarder (mutant)	4
JAK2 MT-kontroll (mutant)	1
JAK2 WT-kontroll (vildtyp)	1
Vatten för kontroll utan mall (No Template Control, NTC)	1
Med JAK2 WT-reaktionsmix	
8 prover med genomiskt DNA	8
JAK2 WT Quant-standarder (vildtyp)	4
JAK2 MT-kontroll (mutant)	1
JAK2 WT-kontroll (vildtyp)	1
Vatten för NTC	1

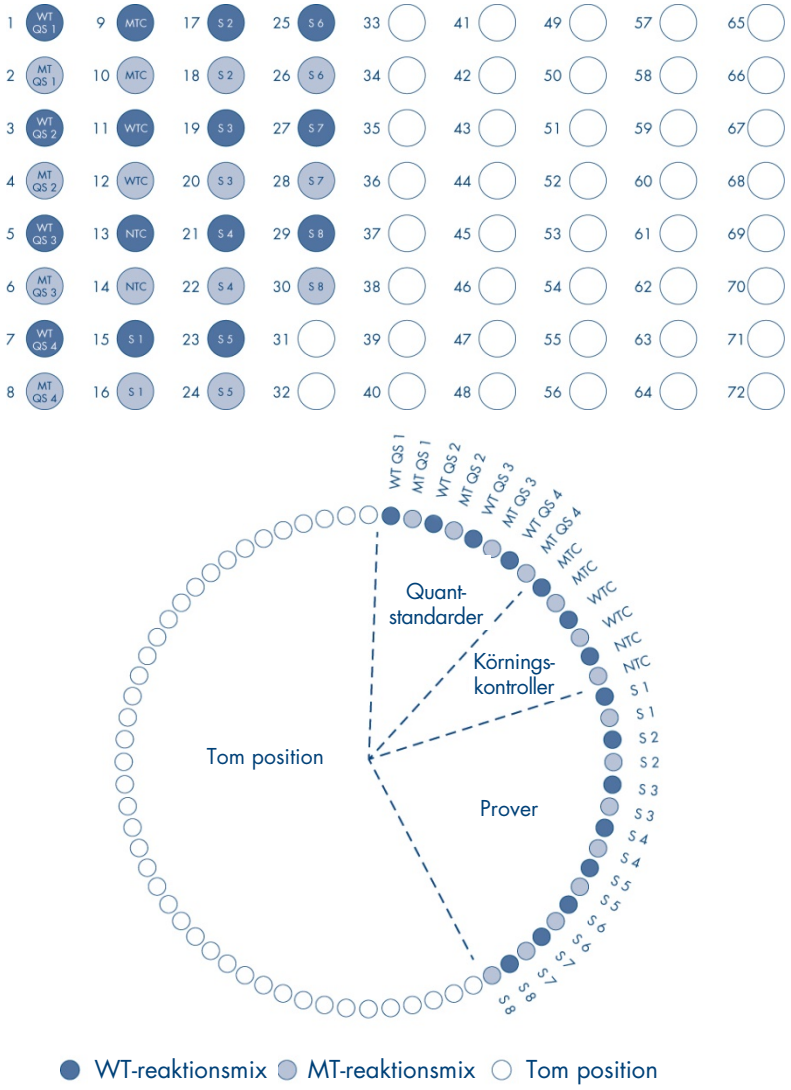

Bild 6. Platt- och rotorkonfiguration för en analys med ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit. WTC: JAK2 WT-kontroll, MTC: JAK2 mutantkontroll (MT), WT-QS: JAK2 WT Quant-standarder, MT-QS: JAK2 MT Quant-standarder, S: prov med genomiskt DNA; NTC: kontroll utan mall (vatten).

Rören måste sättas in i rotorn enligt bild 6 eftersom inställningen för automatisk analys i analysprofilen är baserad på denna organisation. Om du använder en annan layout blir resultaten avvikande.

Obs! Tomma förslutna rör på remsa måste placeras på alla oanvända positioner.

qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72 rör

Saker som måste göras före start:

- Skapa en arbetslista för de prover som ska bearbetas.

Så här skapar du en arbetslista

1. Slå på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
2. Öppna programmet Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 och logga in som användare med operatörsbehörighet i slutet läge (bild 3, ruta 1).
3. Kontrollera att Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet identifieras korrekt i programvaran innan du startar körningen (bild 7).

Bild 7. Anslutningsstatus för Rotor-Gene Q.

4. Klicka på **New manual work list** (Ny manuell arbetslista) i miljön Setup (Inställningar) (bild 8, ruta 1).

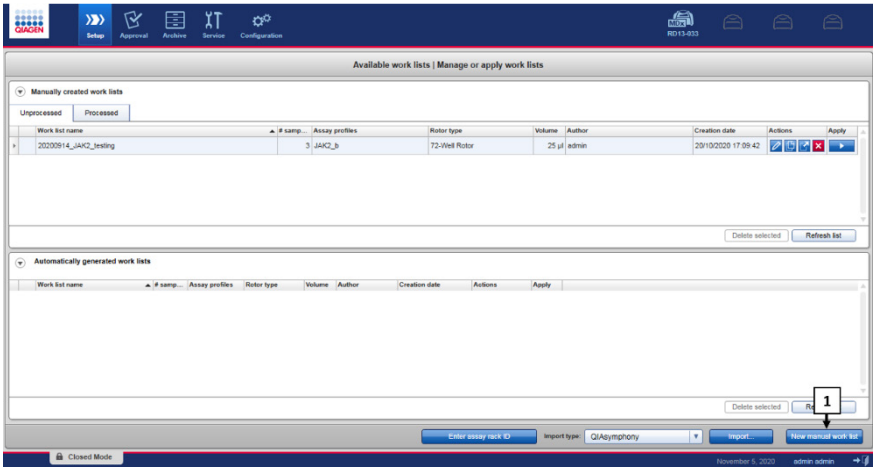

Bild 8. Skapa arbetslista. 1: Knappen för att skapa ny arbetslista.

5. Välj analysprofilen ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR i listan med tillgängliga analysprofiler i Assay-steget (analys) (bild 9, ruta 2).

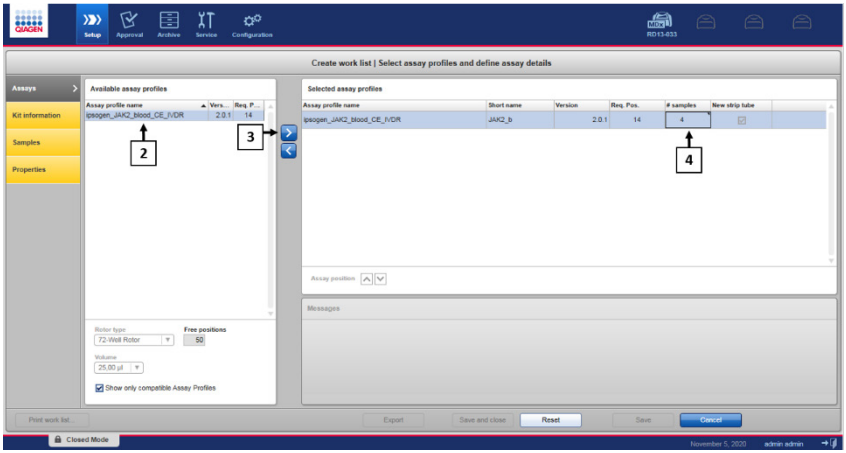

Bild 9. Skapa arbetslista – analysprofilsval. 2: Tillgängliga analysprofiler. 3: Överföring av analysprofil till arbetslista. 4: Ange totalt antal prover.

6. Klicka på **>** för att överföra den valda analysprofilen till listan **Selected assay profiles** (Valda analysprofiler) (bild 9, ruta 3). Analysprofilen ska nu visas i listan **Selected assay profiles** (Valda analysprofiler).
7. Ange antalet prover i det motsvarande fältet (bild 9, ruta 4).
8. Klicka på steget Kit Information (Kitinformation) och ange följande information om JAK2-kitet som är tryckt på locket till förpackningen manuellt:
   - Materialnummer 1120216 (bild 10, ruta 6)
   - Giltigt utgångsdatum (bild 10, ruta 7)
   - Lotnummer (bild 10, ruta 8)

     Obs! Alternativt så kan streckkoden (bild 10, ruta 5) för kitet anges eller skannas.

     Obs! Samtliga fält måste fyllas i. Fälten blir blåa när giltig information har angetts (dvs. kitet har inte uppnått utgångsdatum eller giltigt material och giltiga lotnummer har angetts).

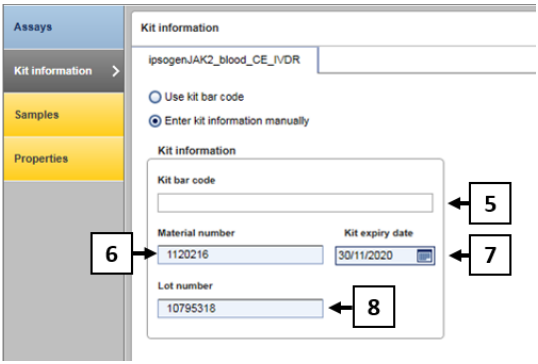

Bild 10. Skapa arbetslista – Ange Kitinformation. 5: Kitstreckkod (skanna eller ange manuellt. Övriga fält fylls i automatiskt när streckkoden har angetts). 6: Materialnummer. 7: Kitets utgångsdatum. 8: Lotnummer. Denna information finns tillgänglig på kitets förpackning.

9. Klicka på steget Samples (Prover).

   En lista med provinformation visas. Denna lista representerar den förväntade layouten för rotorn.

10. Ange providentifieringsnumren (ID) (bild 11, ruta 9) i listan samt eventuell valfri provinformation (bild 11, ruta 10) som en kommentar för varje prov.

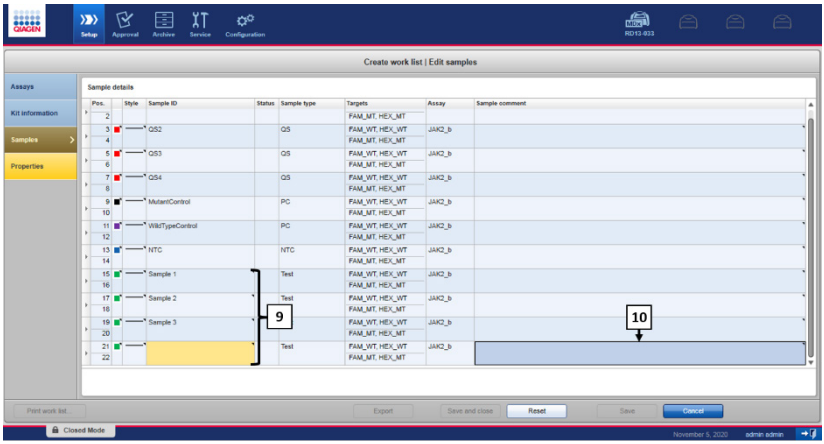

Bild 11. Skapa arbetslista – Ange provinformation. 9: Prov-ID. 10: Provkommentarer (valfritt)

11. Klicka på steget Properties (Egenskaper). Ange namn på arbetslista (bild 12, ruta 11).
12. Markera rutan **Work list is complete (can be applied)** (Arbetslistan är klar (kan appliceras)) (bild 12, ruta 12).

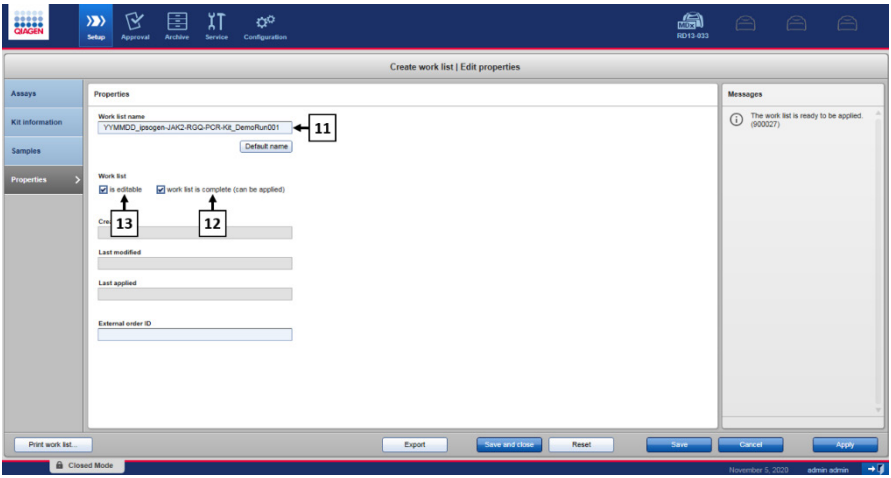

Bild 12. Skapa arbetslista – Egenskaper. 11: Namn på arbetslista. 12: Markera alternativet Work list is complete (Arbetslistan är komplett). 13: Rensa kryssrutan "Is editable" (Redigeringsbar) endast om arbetslistan inte ska ändras.

Obs! Kryssrutan **Is editable** (Redigeringsbar) (bild 12, ruta 13) anger som arbetslistan är redigeringsbar eller inte. Rensa kryssrutan **Is editable** (Redigeringsbar) om arbetslistan kan tillämpas och inte kommer att ändras vid senare tillfälle.

13. Spara arbetslistan.
14. Arbetslistan kan skrivas ut, vilket kan vara till hjälp vid förberedelse och konfiguration av qPCR. Om du vill skriva ut arbetslistan klickar du på **Print work list** (Skriv ut arbetslista). Provinformationen inkluderas som en del av denna arbetslista.

    Obs! Du kan spara arbetslistan och köra senare eller skapa den vid experimentsinmatning i instrumentet och tillämpas på en gång.

Procedur

Konfigurera qPCR-experimentet

1. Tina alla komponenter som behövs förutom *Taq* DNA-polymeraset, som måste förvaras i frys när det inte används. Placera rören som innehåller komponenterna som ska tinas på is.

   Viktigt: Låt inte upptiningstiden överstiga 30 minuter eftersom materialet då kan försämras.

2. Rengör bänkytan som ska användas för beredning av PCR-mix för att säkerställa att mall- eller nukleaskontaminering undviks.
3. Bland rören med standarder, kontroller och reaktionsmixar försiktigt genom att vända på rören upp och ned 10 gånger och centrifugera en kort stund innan användning.
4. Bered följande qPCR-masterblandningar enligt det antal prover som ska bearbetas.

   Obs! Alla koncentrationer avser den slutliga volymen på reaktionen.

   I tabell 4 och tabell 5 beskrivs pipetteringsschemat för beredning av en MT- och en WT-reagensmix, beräknat för att uppnå slutliga reaktionsvolymer på 25 µL. Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel och för att möjliggöra 8 prover plus kontroller.

Tabell 4. Beredning av qPCR-masterblandningar för detektion av JAK2-MT-sekvens

Komponent	1 reaktion (µL)	15 + 1 * reaktioner (µL)	Slutlig koncentration
JAK2 MT-reaktionsmix	19,8	316,8	1x
Taq DNA-polymeras	0,2	3,2	1x
Prov (som ska läggas till i steg 6)	5	5 i varje	–
Total volym	25	25 i varje	–

* En extra reaktionsvolym ingår som dödvolym.

Tabell 5. Beredning av qPCR-masterblandningar för detektion av JAK2-WT-sekvens

Komponent	1 reaktion (µL)	15 + 1* reaktioner (µL)	Slutlig koncentration
JAK2 WT-reaktionsmix	19,8	316,8	1x
Taq DNA-polymeras	0,2	3,2	1x
Prov (som ska läggas till i steg 6)	5	5 i varje	–
Total volym	25	25 i varje	–

* En extra reaktionsvolym ingår som dödvolym.

Viktigt: **Vortexblanda och centrifugera** qPCR-masterblandningen en kort stund innan du fördelar 20 µL per rör.

5. Tillsätt vattnet i kontroll utan mall (NTC, No Template Control) i motsvarande rör och förslut dem.
6. **Viktigt**: **Vortexa och centrifugera DNA** en kort stund (prover med genomiskt DNA plus QS och kontroller). Tillsätt sedan 5 µL material som ska kvantifieras i motsvarande rör på remsa, så att den totala volymen blir 25 µL. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.

   Obs! Var noga med att byta spets mellan varje rör så att du undviker eventuell ospecifik kontaminering från mall eller reaktionsmix, vilket leder till falskt positiva resultat. Börja med att lägga till testproverna och sedan standarder och kontroller.
7. Sätt tillbaka alla *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-komponenter i frysen för att undvika att materialet försämras.

Starta körningen

1. Förbered Rotor-Gene Q MDx och starta körningen på följande sätt.

   1a. Placera rotorn med 72 brunnar på rotorhållaren i Rotor-Gene Q MDx.

   1b. Fyll rotorn med rör på remsa enligt deras tilldelade positioner, med början på position 1 enligt bild 6 (sidan 43) och med tomma förslutna rör på remsa i alla oanvända positioner.

   Obs! Se till att det första röret sätts in på position 1 och att rören på remsa placeras i rätt riktning och på rätt positioner enligt bild 6.

   1c. Sätt dit låsringen.

   1d. Ladda Rotor-Gene Q MDx-instrumentet med rotorn och låsringen och stäng instrumentluckan.

   1e. I programvaran Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 väljer du antingen den motsvarande arbetslistan i Work list Manager och klickar på **Apply (Tillämpa)** (bild 13, ruta 14) eller klicka på **Apply** (Tillämpa) om arbetslistan fortfarande är öppen.

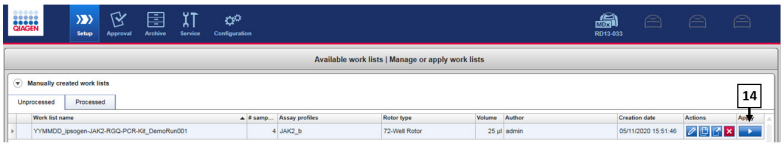

Bild 13. Körningskonfiguration – Val av arbetslista. 14: Knappen Apply (Tillämpa).

Obs! Om arbetslistan som är dedikerad till experimentet inte har skapats ännu loggar du in i Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 och följer steget Så här skapar du en arbetslista på sidan 45 innan du fortsätter enligt nedan.

- Ange namnet på experimentet (bild 14, ruta 15).
- I listan **Cycler selection** (Val av cykler) väljer du den cykel som ska användas (bild 14, ruta 16). "
- Kontrollera att låsringen sitter fast på rätt sätt och bekräfta på skärmen att låsringen är fastsatt (bild 14, ruta 17).
- Klicka på **Start run** (Starta körning) (bild 14, ruta 18).

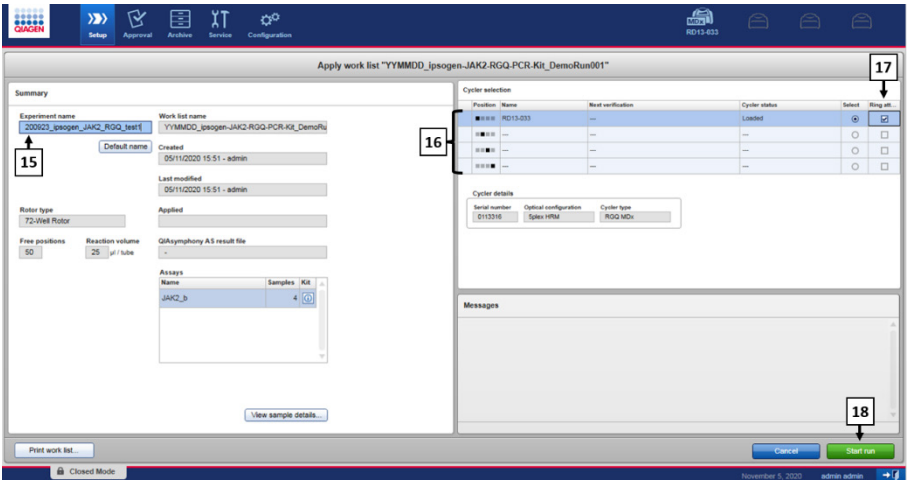

Bild 14. Körningskonfiguration – Körningsinställningar. 15: Experimentnamn. 16: Cyklerval. 17: Kontrollera och bekräfta att låsringen sitter fast. 18: Knappen Start Run (Starta körning).

1f. Körningen JAK2 RGQ PCR ska då starta.

Avsluta, låsa upp och godkänna körningen

1. När körningen är klar klickar du på **Finish run** (Avsluta körning).

   Obs! Innan det här steget har slutförts sparas inte experimentet i den interna databasen.

   Obs! Analysen av insamlade data utförs automatiskt beroende på det plugin-program som motsvarar analysprofilen och de regler och parametervärden som definieras av analysprofilen.

2. Visa/låsa upp och godkänna körningen.
   - Användare som är inloggade med behörigheten Approver (Godkännare) ska klicka på **Release and go to approval** (Publicera och gå till godkännande).
   - Användare som är inloggade med behörigheten Operator (Operatör) ska klicka på **Release** (Publicera).

Obs! De allmänna funktionerna i godkännandemiljön beskrivs i användarhandboken för Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 Gamma-tillägget.

3. Visa/lås upp resultaten.
   - Om du klickade på **Release and go to approval** (Publicera och gå till godkännande) visas resultatet av experimentet i miljön Approval (Godkännande).
   - Om alternativet **Release** (Frigör) aktiveras måste en användare med rollen Approver (Godkännare) logga in och välja miljön "Approval" (Godkännande).

     - Tillämpa filteralternativen (bild 15, ruta 19) för att välja vilket experiment som ska godkännas (bild 15, ruta 20). Klicka sedan på **Apply (Tillämpa)** (bild 15, ruta 21).

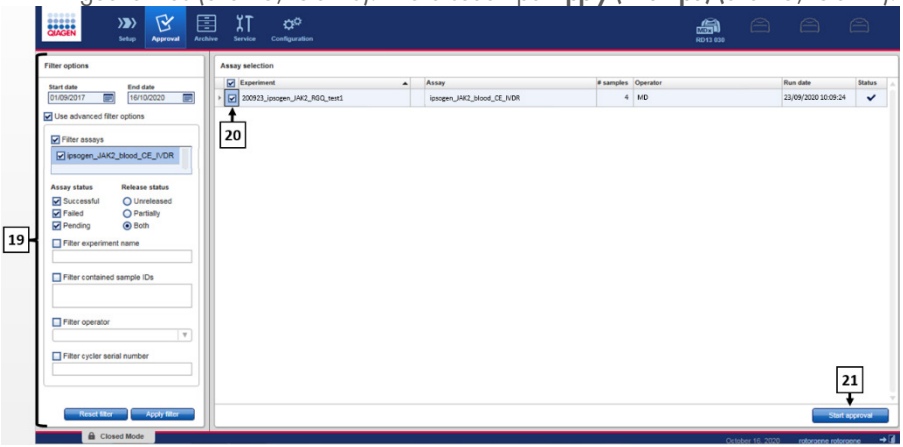

Bild 15. Kör godkännande – Val av experiment. 19: Filteralternativ. 20: Analysval. 21: Knappen Start approval (Starta godkännande).

     - Följande AUDAS-avisering (Automatisk Dataskanning) visas (bild 16). I avsnittet Plots and Information (Diagram och information) kontrollerar du om avvikelser (t.ex. toppar som beror på maskinvarufel) uppstått i HEX-målens fluorescensdiagram.

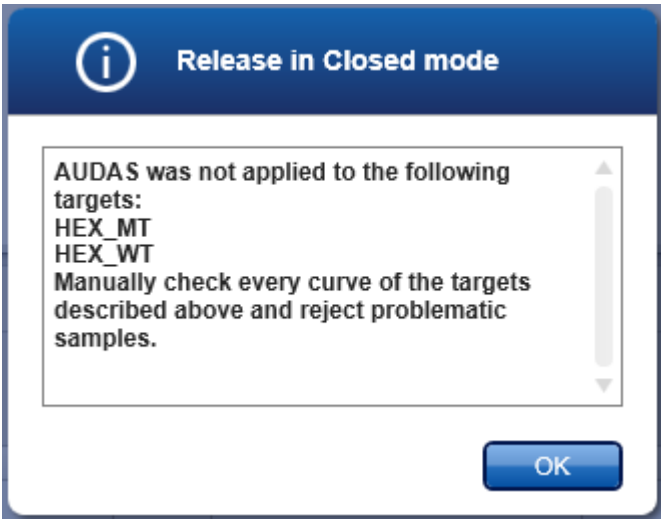

Bild 16. AUDAS-larm.

Obs! Diagrammen för HEX-målen för intern kontroll inte uppvisar typiskt sigmoidala former (som i exempeldiagrammen på bild 17) och måste anses som giltiga diagram. Observera även att alla övriga validitetskriterier för interna kontroller (t.ex. C_T-brytfrekvenser) automatiskt kontrolleras av programvaran.

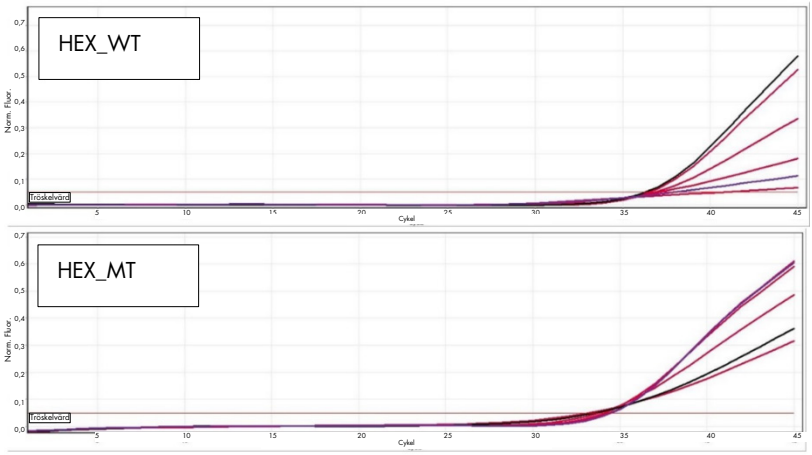

Bild 17. Intern kontroll av HEX-diagram.

Resultaten för testproverna analyseras automatiskt av Rotor-Gene AssayManager v. 2.1, men måste godkännas och låsas upp av en användare med behörigheten Approver (Godkännare). Samtliga testprover har till en början statusen Undefined (Odefinierad) när experimentet har slutförts. Provresultat som behöver godkännas har tre knappar för godkännande i slutet av den dedikerade raden. Dessa knappar används till att acceptera eller avvisa provresultaten (bild 18 och bild 19).

Obs! Prover som Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 anger som INVALID (Ogiltigt) kan inte ändras till VALID (Giltigt) även om provresultatet avvisas.

Obs! Om användaren inte håller med om provresultaten och vill testa på nytt (t.ex. om diagrammen för HEX-målen uppvisar avvikelser under den interna kontrollen) ska det befintliga provet avvisas.

- Granska resultatet (bild 19, ruta 22) och klicka på **Release/Report data** (Publicera/rapportera data) (bild 19, ruta 23).

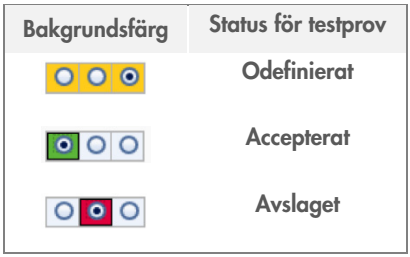

Bild 18. Definition av provets godkännandestatus.

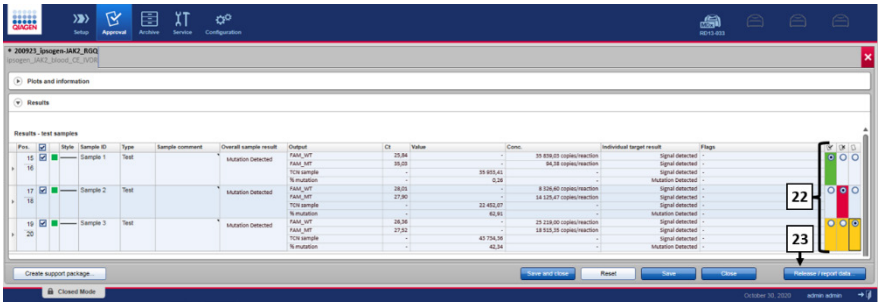

Bild 19. Publicera och rapportera data. 22: Knapparna Provgodkännande (för att godkänna (✓) eller avvisa (✕) resultat för varje prov). 23: Knappen Release and report data (Publicera och rapportera data).

- Ange lösenord vid behov och markera rutan **Create report** (Skapa rapport). Klicka sedan på **OK** (bild 20, rutorna 24 och 25). Rapporten genereras i .pdf-format och sparas automatiskt i den fördefinierade mappen.
  Standardsökvägen till mappen är:
  C: > Users (Användare) > Public (Allmänt) > Documents (Dokument) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Exportera) > Reports (Rapporter)
  Obs! Denna sökväg och mapp kan ändras i miljön Configuration (Konfiguration).
- En LIMS-fil skapas automatiskt vid samma tidpunkt och sparas i den fördefinierade mappen. Standardsökvägen till mappen är: **C: > Users (Användare) > Public (Allmänt) > Documents (Dokument)> QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Exportera) > LIMS.**
  Obs! Denna sökväg och mapp kan ändras i miljön "Configuration" (Konfiguration).
- Stäng pdf-filen och gå tillbaka till Rotor-Gene AssayManager. Klicka på **OK** vid uppmaning (bild 20, ruta 26).

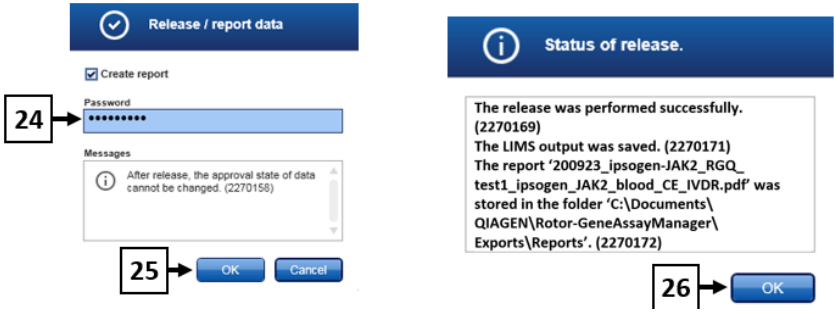

Bild 20. Publicera och rapportera data. 24: Användarlösenord. 25–26: Välj med knappen OK.

- En pdf-rapport skapas och öppnas när du anger användarlösenordet. Stäng pdf-rapporten. En LIMS-fil skapas sedan automatiskt och ett publiceringsmeddelande visas. Klicka på **OK**. Analysen är nu helt publicerad. Klicka på **OK** för att gå till miljön Archive (Arkiv).

- Klicka på fliken Archive (Arkiv) för att exportera .rex-filen som motsvarar rådatan. Leta reda på experimentet med hjälp av filteralternativen (bild 21, rutorna 27 och 28) och klicka på **Show assays** (Visa analyser) (bild 21, ruta 29).

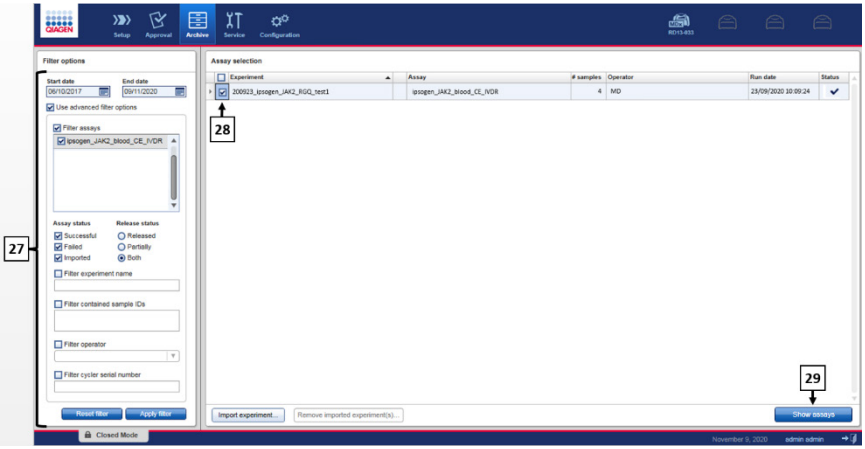

Bild 21. Arkivmiljö. 27: Filteralternativ. 28: Analysval. 29: Knapp för att visa analyser.

- Experimentresultaten visas. Välj **.rex-fil** som den filtyp som ska exporteras längst ned till höger på skärmen. Klicka på "**Export**" (Exportera). Klicka på "**OK"** för att spara. Programmet sparar automatiskt .rex-filen i följande fördefinierade mapp: **C: > Användare > Allmänt > Dokument > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Exportera > Experiment.**
  Obs! Du kan ändra den här sökvägen och mappen på fliken Specify the .rex file export destination (Ange exportplats för .rex-filen).
  Obs! För felsökning krävs ett supportpaket från körningen. Supportpaket kan genereras från miljön för godkännande eller arkivering (*användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* avsnittet "Troubleshooting" (Felsökning), "Creating a support package" (Skapa ett supportpaket)). Dessutom kan granskningsspåret från tiden för incidenten ± 1 dag vara till god hjälp. Granskningsspåret finns i Service-miljön (*Användarhandboken till Rotor-Gene AssayManager v. 2.1-huvudprogrammet*, avsnitt 1.5.5.5).

4. Ta ut materialet från Rotor-Gene Q MDx-instrumentet och kassera rören på remsa i enlighet med lokala säkerhetsföreskrifter.

Tolkning av resultat

Analysen är helt automatisk.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyserar först* förstärkningsgrafer, och kan ogiltigförklara avvikande grafer beroende på deras form och brusamplitud. Om så är fallet associeras en flagga med den ogiltigförklarade kurvan.

Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 analyserar sedan körningskontrollerna:

- NTC: NTC kontrolleras avseende frånvaro av specifik amplifiering (JAK2 WT och JAK2 MT).
- WT och MT QS: Valideringen av kvantifieringsstandarderna baseras på R^2- och lutningsvärdena för varje standardkurva.
- WTC: Det totala antalet JAK2-kopior (TCN) måste vara stort nog för att den här kontrollen ska kunna tolkas. Om så är fallet kommer procentandelen JAK2-mutation att beräknas. Den här körningskontrollen valideras om den har statusen WT enligt testet.
- MTC: Det totala antalet JAK2-kopior måste vara stort nog för att den här kontrollen ska kunna tolkas. Om så är fallet kommer procentandelen JAK2-mutation att beräknas. Den här körningskontrollen valideras om dess status är högt positiv för JAK2-mutationen.

Den interna kontrollen (Internal Control, IC) måste amplifieras i alla brunnar med kontroll- eller kvantifieringsstandarder och ligga inom det fördefinierade kontrollintervallet.

Obs! Rapporten som genereras i slutet av varje körning visar resultaten som erhållits med körningskontrollerna. En ogiltigförklarande flagga läggs till på alla ogiltiga data (tabell 6).

* Enbart aktiverat för FAM-mål.

Flaggan ASSAY_INVALID (ANALYS OGILTIG) används om någon av dessa körningskontroller inte överensstämmer. Om den här flaggan har markerats ska körningen klassas som ogiltig och experimentet måste utföras på nytt.

Testproverna analyseras i Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 om alla kontrollerna i körningen överensstämmer.

- Den interna kontrollen (Internal Control, IC) måste amplifieras i alla brunnar med prover och ligga inom det fördefinierade intervallet.
- Det totala antalet kopior måste vara stort nog för varje prov för att kunna tolka resultaten.
- Procentandelen JAK2-mutation beräknas sedan och resultatet visas. Ett CT-värde måste observeras i varje rör (WT och MT) för att ett prov ska valideras av Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 och för att motsvarande resultat ska vara giltigt.
  Obs! Om både körningskontrollerna och provresultaten är giltiga visar rapporten antalet kopior och mutationsprocentandelen för varje prov.
- I tabell 6 visas de ogiltigförklarande provflaggorna som kan tilldelas enskilda rör av Rotor-Gene AssayManager v2.1 under analysen, tillsammans med en förklaring av vad varje flagga betyder.
- I Tabell 7 (sidan 64) visas varningsprovflaggor och beskrivning av termer.

Tabell 6. Ogiltigförklarande provflaggor och beskrivning av termer

Flagga	Beskrivning
ANALYSIS_FAILED	Analysen är ogiltig eftersom den misslyckades. Kontakta QIAGENs tekniska service.
ASSAY_INVALID	Analysen är ogiltig eftersom minst en extern kontroll är ogiltig.
CONSECUTIVE_FAULT	Ett mål som användes vid beräkningen av det här målet är ogiltigt.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Förstärkningsgrafen med rådata visar en form som avviker från det etablerade beteendet för den här analysen. Det finns en hög sannolikhet för felaktiga eller feltolkade resultat.
FLAT_BUMP	Förstärkningsgrafen med rådata visar en form som liknar en vägbula med svag upphöjning som avviker från det etablerade beteendet för den här analysen. Det finns en hög sannolikhet för felaktiga eller feltolkade resultat (t.ex. felbestämning av C_T-värde).
INVALID_CALCULATION	Beräkningen för det här målet misslyckades.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	Det detekterade C_T-värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som mutantkontrollen med vildtyp-reaktionsmixen.
MC_IC_LOW_CT (WT)	Det detekterade C_T-värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som mutantkontrollen med vildtyp-reaktionsmixen.
MC_IC_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C_T-värde för internkontrollen i samma rör som mutantkontrollen med mutantreaktionsmixen.
MC_IC_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C_T-värde för internkontrollen i samma rör som mutantkontrollen med vildtyp-reaktionsmixen.
MC_LOW_CN	Antalet kopior för mutantkontrollen är för lågt.
MC_LOW_PERCENTAGE	Procentandelen mutation för mutantkontrollen är för låg.
MC_NO_CN	Antal kopior saknas för mutantkontrollen.
MC_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C_T-värde för mutantkontrollen med mutantreaktionsmix.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 6. Ogiltigförklarande provflaggor och beskrivning av termer (forts.)

Flagga	Beskrivning
MC_NO_VALUE	Procentandelen mutation för mutantkontrollen saknar värde.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Detekterbart C_T-värde för mutantkontrollen med mutantreaktionsmixen är lägre än förväntat.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Detekterbart C_T-värde för mutantkontrollen med vildtyp-reaktionsmixen är lägre än förväntat.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Förstärkningsgrafen korsar tröskelvärdet mer än en gång. Ett entydigt C_T-värde kan inte bestämmas.
NO_BASELINE	Ingen initial baseline har hittats. Den efterföljande analysen kan inte utföras.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	Det detekterade C_T-värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som kontrollen utan mall med mutantreaktionsmix.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	Det detekterade C_T-värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som kontrollen utan mall med vildtyp-reaktionsmix.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C_T-värde för internkontrollen i samma rör som kontrollen utan mall med mutantreaktionsmix.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C_T-värde för internkontrollen i samma rör som kontrollen utan mall med vildtyp-reaktionsmix.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	Det detekterade C_T-värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som kontrollen utan mall med mutantreaktionsmix.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	Det detekterade C_T-värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som kontrollen utan mall med vildtyp-reaktionsmix.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	C_T har detekterats i kontrollen utan mall.
OTHER_TARGET_INVALID	Ett annat mål för samma prov är ogiltigt.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	Den beräknade koncentrationen för det här provet överstiger den tekniska gränsen.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 6. Ogiltigförklarande provflaggor och beskrivning av termer (forts.)

Flagga	Beskrivning
QS_HIGH_SLOPE (MT)	Den övre gränsen för mutantlutningen har överstigits.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	Den övre gränsen för vildtyp-lutningen har överstigits.
QS_IC_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C_T-värde för internkontrollen i samma rör som en eller flera av mutant-kvantifieringsstandarderna.
QS_IC_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C_T-värde för internkontrollen i samma rör som en eller flera av vildtyp-kvantifieringsstandarderna.
QS_LOW_SLOPE (MT)	Den nedre gränsen för mutantlutningen har inte uppfyllts.
QS_LOW_SLOPE (WT)	Den nedre gränsen för vildtyp-lutningen har inte uppfyllts.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	Den nedre gränsen för mutant-R^2 har inte uppfyllts.
QS_LOW_RSQUARED (WT)	Den nedre gränsen för vildtyp-R^2 har inte uppfyllts.
QS_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C_T-värde för en eller flera av mutant-kvantifieringsstandarderna.
QS_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C_T-värde för en eller flera av vildtyp-kvantifieringsstandarderna.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Detekterbart C_T-värde för en eller flera av mutant-kvantifieringsstandarderna är lägre än förväntat.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Detekterbart C_T-värde för en eller flera av vildtyp-kvantifieringsstandarderna är lägre än förväntat.
RUN_FAILED	Analysen är ogiltig eftersom ett problem uppstått med cyklern eller cykleranslutningen.
RUN_STOPPED	Analysen är ogiltig eftersom körningen har stoppats manuellt.
SAMPLE_LOW_CN	Det totala antalet kopior för testprovet är för lågt.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	Det detekterade C_T-värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som ett testprov med mutantreaktionsmix.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 6. Ogiltigförklarande provflaggor och beskrivning av termer (forts.)

Flagga	Beskrivning
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	Det detekterade C_T-värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som ett testprov med mutantreaktionsmix.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Inget detekterbart C_T-värde för internkontrollen i samma rör som ett testprov med mutantreaktionsmix.
SAMPLE_NO_CN	Antal kopior för testprov saknas.
SAMPLE_NO_VALUE	Procentandelen mutation för ett testprov saknar värde.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Detekterbart C-värd$_T$-värde för ett testprov med mutantreaktionsmix är lägre än förväntat.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Detekterbart Ct-värde$_T$-värde för ett testprov med vildtyp-reaktionsmix är lägre än förväntat.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	Det detekterade C_T-värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som ett testprov med vildtyp-reaktionsmix.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	Det detekterade C_T-värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som ett testprov med vildtyp-reaktionsmix.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Inget detekterbart C_T-värde för internkontrollen i samma rör som ett testprov med vildtyp-reaktionsmix.
SATURATION	Rådata för fluorescensen mättas kraftigt innan brytpunkten på förstärkningsgrafen.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	En topp har detekterats i förstärkningsgrafen nära C_T-värdet.
STEEP_BASELINE	En brant stigande baslinje för rådata för fluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafen.
STRONG_BASELINE_DIP	Ett kraftigt fall i baslinjen för rådata för fluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafen.
STRONG_NOISE	Högt brus har detekterats utanför tillväxtfasen i förstärkningsgrafen.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 6. Ogiltigförklarande provflaggor och beskrivning av termer (forts.)

Flagga	Beskrivning
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Högt brus har detekterats i tillväxtfasen (exponentiella fasen) i förstärkningsgrafen.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	En vågliknande baslinje för rådata för fluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafen.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	Procentandelen mutation för vildtyp-kontrollen är för hög.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	Det detekterade C_T-värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som vildtyp-kontrollen med mutantreaktionsmix.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	Det detekterade C_T-värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som vildtyp-kontrollen med mutantreaktionsmix.
WTC_IC_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C_T-värde för internkontrollen i samma rör som vildtyp-kontrollen med mutantreaktionsmix.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C_T-värde för internkontrollen i samma rör som vildtyp-kontrollen med vildtyp-reaktionsmix.
WTC_NO_CN	Antal kopior saknas för vildtyp-kontrollen.
WTC_NO_VALUE	Procentandelen mutation för vildtyp-kontrollen saknar värde.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Detekterbart C_T-värde för vildtyp-kontrollen med mutantreaktionsmix är lägre än förväntat.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Detekterbart C_T-värde för vildtyp-kontrollen med vildtyp-reaktionsmix är lägre än förväntat.

Tabell 7. Varningsprovflaggor och beskrivning av termer

Flagga	Beskrivning
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Ändringen av procentandel fluorescens för det här provet i förhållande till det provrör med störst fluorescensändring är lägre än en definierad gräns.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Reaktionseffektiviteten för det här provet har inte uppnått en definierad gräns.
SPIKE	En topp i rådatafluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafen, men utanför det område där C_T bestäms.

Begränsningar

Det här kitet är avsett för professionell användning.

Produkten är endast avsedd att användas av personal som fått särskild utbildning i molekylärbiologiteknik och är väl förtrogna med enhetstekniken. Enheten ska tillämpas i molekylärbiologiska laboratoriemiljöer.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit är inte en automatiserad enhet men analysen utförs med hjälp av en dedikerad programvara för automatisk mutationskvantifiering.

Kitet ska användas i enlighet med anvisningarna i denna handbok, i kombination med ett validerat instrument som omnämns i ”Material som behövs men inte medföljer” på sidan 19.

Var uppmärksam på de utgångsdatum som anges på förpackningens etikett och etiketterna på rören. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat.

Alla reagenser som medföljer *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma kit. Om dessa riktlinjer inte följs kan prestandan påverkas.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit är endast validerat för humant, perifert antikoagulerat helblod med 2K-EDTA från patienter med misstänkt eller fastställd MPN.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit är endast validerat för användning med QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) eller QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104).

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit är endast validerat för användning med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (för PCR) och QIAsymphony SP (för provberedning).

Om denna produkt används utanför indikationen och/eller om komponenterna modifieras, upphör ansvarsskyldigheten för QIAGEN.

Alla diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska, patologiska fynd. Frånvaro av JAK2 V617F/G1849T-mutation utesluter inte förekomst av andra JAK2-mutationer. Testet kan rapportera falska negativa resultat om andra mutationer förekommer i nukleotider 88504 till 88622 (16).

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

Prestandaegenskaper

Analytisk prestanda

Blankgräns

Blankgräns (Limit of Blank, LoB) fastställdes enligt standarden CLSI/NCCLS EP17-A2 på helblodsprover från 30 friska blodgivare med en vildtyp-(WT) JAK2-status med tre reagensloter (120 mätningar/loter).

LOB-resultaten sammanfattas i tabell 8. Detta motsvarar det förväntade värdet för en normal population med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Tabell 8. Sammanfattning av LOB-resultat

	Uppmätt LOB	Slutlig blankgräns
Lot 1	0 %	
Lot 2	0 %	0 %
Lot 3	0 %	

Detektionsgräns

Detektionsgräns (Limit of Detection, LOD) eller analytisk känslighet) fastställdes baserat på den ”Probit approach” som beskrivs i standarden CLSI/NCCLS EP17-A2. I den här studien analyserades sex lågnivåmutationer för tre oberoende prover (MPN-DNA från helblod spikat med vildtyp-DNA från helblod), med tre loter, 60 mätningar per prov och per mutation. Resultaten som erhölls indikerade att den analytiska känsligheten var 0,042 % för JAK2 V617F-mutationen.

LOD-resultaten sammanfattas i tabell 9.

Tabell 9. Sammanfattning av LOD-resultat

	Uppmätt LOD	Slutlig detektionsgräns
Lot 1	0,041 %	
Lot 2	0,029 %	0,042 %
Lot 3	0,042 %	

Kvantifieringsgräns

Kvantifieringsgränsens (Limit of Quantitation, LoQ) definition och bestämning baseras på riktlinjerna för CLSI/NCCLS EP17-A2. LoQ definierade som den lägsta JAK2 V617F-mutationsprocentnivån som enkelt kan skiljas från LoD från *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit med ett konfidensintervall på 95 % (felrisk på 0,05). Data från repeterbarhetsstudien på enskild anläggning användes för att beräkna LoQ i *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Resultaten som erhölls indikerade att LoQ var 0,233 % för JAK2 V617F-mutationen.

Vid övervakning av molekylära sjukdomar innebär detta att den uppmätta JAK2 V617F-mutationsprocenten vid ett tillfälle låg under 0,233 %. Minskning av JAK2 V617F-allelbelastningen kunder inte kvantifieras på ett tillförligt sätt vid nästa tidspunkt.

Linjäritet

Linjäriteten för kvantifieringen av JAK2-mutation hos MPN-patienter bedömdes enligt standarden CLSI/NCCLS EP06AE, med en lot från *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit och med testning på 11 mutationsnivåer för fem olika DNA-inputnivåer. Kvantifieringen av JAK2-mutationsbelastningen i MPN-prover är linjär, dvs. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit kan DNA kvantifiera prover från LOD-värdet till 100 % mutation vilket motsvarar de förväntade värdena för den berörda population, så länge som den kvantifierade provkoncentrationen ligger nära 10 ng/µL (mellan 5 och 20 ng/µL).

Repeterbarhet och repeterbarhet

Precisionstudieutformningen för enskild anläggning uppfyller kraven i standarden CLSI/NCCLS EP5-A3. Testningen utfördes på 11 mutationsnivåer, från 0,07 till 72,67 % med seriella spädningar av ett kliniskt prov från en MPN-patient. 108 mätningar erhölls från varje mutationsnivå av tre operatörer under 27 dagar (två replikat per körning och två körningar per dag) med hjälp av tre *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-loter och tre Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Precisionen för 100-procentsnivån uttrycks i jämförelse med den angivna precisionen för nivån på 72,67 %, baserat på trendanalyser med stöd från ytterligare data som erhållits från JAK2 V617F-prov på 100 % bestående av DNA från MUTZ-8-cellinjen (38 mätningar).

Resultaten sammanfattas i tabell 10.

Tabell 10. Precisionsresultat: repeterbarhet (studie på enskild anläggning)

Prov	Medelvärde procentandel mutation JAK2	SD_{R+}	SD_{RUN++}	$SD_{TOTAL+++}$	CV_{TOTAL}
S0	100	ND	ND	≤ 5,45	≤ 7,50 %
S1	72,67	1,99	2,99	5,45	7,50 %
S2	53,96	2,48	3,16	6,52	12,09 %
S3	23,13	1,59	1,95	4,51	19,52 %
S4	11,97	1,10	1,17	2,79	23,27 %
S5	6,01	0,71	0,63	1,57	26,17 %
S6	2,39	0,31	0,36	0,70	29,23 %
S7	1,23	0,17	0,16	0,34	27,38 %
S8	0,63	0,13	0,12	0,24	37,88 %
S9	0,13	0,05	0,03	0,07	52,31 %
S10	0,07	0,03	0,02	0,04	65,01 %

SD: Standard deviation (Standardavvikelse)

R+: Repeterbarhet

RUN++: Precision mellan körning

TOTAL+++: Total precision (inklusive mellan instrument, användare och loter)

CV_{TOTAL}: Variationskoefficienten för total precision i procent

ND: Not determined (Ej bestämt)

Precisionstudieutformningen för laboratorium uppfyller kraven i standarden CLSI/NCCLS EP5-A3. Fyra anläggningar deltog i studien (en i Frankrike, en i Tyskland och två i USA). Testningen utfördes på 7 mutationsnivåer, från 1,21 till 67,64 % med spädning av MUTZ-8-cellinjen i helblodsprover från en frisk blodgivare (dvs. anskaffade prover). Tre DNA-extraktioner utfördes med QIAsymphony SP-instrumentet och en unik QIAsymphony DSP DNA Mini Kit-batch på varje anläggning. Åtta qPCR-körningar utfördes för varje DNA-extraktion (två körningar per dag och anläggning under fyra dagar (ej i följd)) med en *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-batch, vilket gav upp till 96 förväntade mätningar per test på samtliga anläggningar.

I en av extraktionskörningarna var L2-provet ogiltigt, vilket minskade antalet qPCR-tester från 96 till 88. Även en qPCR-körning visades sig vara ogiltig, vilket innebar tre ogiltiga tester för samtliga prover (förutom L2, dvs två ogiltiga resultat). Dessutom var L7- provet ogiltigt i en qPCR-körning och L4 ogiltigt i två qPCR-körningarna, vilket ledde till två ytterligare ogiltiga tester (tabell 11).

Precisionen för 100-procentsnivån uttrycks i jämförelse med den angivna precisionen för nivån på 67,64%, baserat på trendanalyser med stöd från ytterligare data som erhållits från JAK2 V617F-prov på 100 % bestående av DNA från MUTZ-8-cellinjen (38 mätningar).

Tabell 11. Precisionsresultat: reproducerbarhet (studie i laboratorium)

Prov	Totalt antal tester	Totalt antal ogiltiga tester	JAK2%MT medel	Mellan körning, SD, %CV	Mellan körning under dagen, SD, %CV	Mellan dagar, SD, %CV	Mellan platser, SD, %CV	Total, SD, %CV
L0	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	100	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	≤ 4,074, ≤ 6,02
L1	96	3	67,64	2,616, 3,87	2,060, 3,05	1,999, 2,96	1,530, 2,26	4,074, 6,02
L2	88	2	40,03	3,482, 8,70	1,011, 2,53	2,389, 5,97	0,986, 2,46	4,387, 10,96
L3	96	3	22,26	3,318, 14,90	1,256, 5,64	1,257, 5,64	0,803, 3,61	3,807, 17,10
L4	96	5	8,02	1,770, 22,06	0,516, 6,44	0,000, 0,00	0,000, 0,00	1,841, 22,95
L5	96	3	4,35	0,706, 6,23	0,547, 12,57	0,000, 0,00	0,197, 4,53	0,906, 20,82
L6	96	3	2,03	0,246, 12,15	0,365, 18,00	0,063, 3,11	0,000, 0,00	0,441, 21,76
L7	96	4	1,21	0,104, 8,62	0,057, 4,72	0,211, 17,43	0,000, 0,00	0,189, 15,64

JAK2%MT: JAK2-mutationsprocent **SD**: Standardavvikelse, **CV**: Variationskoefficient i procent **Ej tillämpligt**: Ej tillämpligt

En ytterligare studie i laboratorium utfördes på tre testplatser (en i Europa och två i USA). Studien baserades på fyra helblodsprover från MPN-patienter (dvs. kliniskt prover). Tre DNA-extraktionskörningar utfördes på varje anläggning. Varje DNA-extraktion testades i 12 qPCR-körningar (ett replikat per körning och prov, två prover per dag på varje anläggning utförda av operatörer (två operatörer på varje anläggning) under tre dagar (ej i följd)) på ett Rotor-Gene Q MDx-instrument med en enskild *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-lot. 36 mätningar erhölls för varje prov (tabell 12).

Tabell 12. Ytterligare resultat från studie i laboratorium

Prov	N	JAK2%MT medel	Mellan körning, SD, %CV	Mellan körning under dagen, SD, %CV	Mellan dagar, SD, %CV	Mellan platser, SD, %CV	Total, SD, %CV
Prov 1	36	95,19	0,995, 1,04	0,000, 0,00	0,541, 0,57	0,000, 0,00	1,130, 1,19
Prov 2	36	22,83	3,988, 17,47	0,000, 0,00	1,707, 7,48	1,552, 6,80	4,501, 19,72
Prov 3	36	14,44	2,257, 15,63	1,398, 9,68	0,000, 0,00	1,422, 9,84	2,890, 20,01
Prov 4	36	4,03	0,186, 4,63	0,835, 20,74	0,000, 0,00	0,608, 15,09	0,922, 22,91

JAK2%MT: JAK2-mutationsprocent **N**: Antal mätningar **SD**: Standardavvikelse **CV**: Variationskoefficient i procent

Interfererande ämnen (analytisk specificitet)

Studiens utformning uppfyller kraven i NCCLS-standard EP7-A3 "Interference Testing in clinical Chemistry" (Interferenstest i klinisk kemi). Totalt 19 potentiellt förekommande substanser i blodprover valdes för sin potentiella effekt på PCR (busulfan, citalopramhydrobromid, paroxetinhydrokloridhemihydrat, sertralinhydroklorid, fluoxetinhydroklorid, acetaminofen (paracetamol), okonjugerat bilirubin, kalium-2K-EDTA och 3K-EDTA, natrium-EDTA, Hgb (humant), triglycerider, lisinoprildihydrat, hydroxyurea, acetylsalicylsyra, salicylsyra, tiotepa, anagrelid, interferon alpha 2b).

Även ämnen från DNA-extraktionsprocessen utvärderades (QSL1, QSB1, QSW1, QSW2 och PK från QIAsymphony DSP DNA Blood Mini Kit, QIAGEN Protease, etanol, AW1 och AW2 från QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit).

Resultaten som erhölls visade ingen interfererande effekt för dessa substanser.

Tabell 13. Interfererande ämnen

Testat ämne	Testkoncentration
Okonjugerat bilirubin	150,3 µg/mL
Hemoglobin [humant]	2 000 µg/mL
Triglycerider	30 000 µg/mL
Busulfan	38,4 µg/mL
Citalopramhydrobromid	0,75 µg/mL
Paroxetinhydrokloridhemihydrat	1,14 µg/mL
Sertralinhydroklorid	0,67 µg/mL
Fluoxetinhydroklorid	3,87 µg/mL
Acetaminofen [paracetamol]	200,7 µg/mL
Lisinoprildihydrat	0,33 µg/mL
Hydroxyurea	28,2 µg/mL
Acetylsalicylsyra	651,6 µg/mL
Salicylsyra	0,6 µg/mL
Tiotepa	48 µg/mL
Anagrelid	6 µg/mL
Interferon alpha 2b*	1,8 MU/L
Kalium-EDTA (2K-EDTA)	2 X (3 600 µg/mL)
Kalium-EDTA (3K-EDTA) †	1 X (1 800 µg/mL), 3 X (5 400 µg/mL)

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 13. Interfererande ämnen (forts.)

Testat ämne	Testkoncentration
Natrium-EDTA (2Na-EDTA) †	1 X (3 000 µg/ml), 3 X (9 000 µg/ml)
QSL1	2 % av total provvolym
QSB1	2 % av total provvolym
QSW1	2 % av total provvolym
QSW2	2 % av total provvolym
proteinas K (PK) ‡	2 % av total provvolym
proteinas K (PK) ‡	2 x den förväntade återstående volymen efter extraktionsprocessen 3 x den förväntade återstående volymen efter extraktionsprocessen
QIAGEN Protease	1,29E-05 % av total provvolym
Etanol (EtOH)	1,29E-03 % av total provvolym
Buffer AW1	1,00 E-01 % av total provvolym
Buffer AW2	1,00 % av total provvolym

* Rekommenderad dosering för PV-patienter är 3 MU som distribueras i fem liter blod (person på 80 kg), vilket innebär en koncentration på 0,6 MU/L. Tre gånger denna koncentration (dvs. 1,8 MU/L) testades i enlighet med rekommendationer från NCCLS standarden EP7-A2.

† 1 x koncentration enligt leverantören

‡ PK orsakar en störning vid testning av 2 % av den totala provvolymen (ovanligt förekommande). Ytterligare tester visade att PK försvann under extraktionsprocessen. Inga störningar ska ske under normala förhållanden.

Test av Genomik JAK2 V617F (NIBSC, panelkod 16/120) av WHO:s internationella referenspanel.

WHO:s första internationella referenspanel för Genomik JAK2 V617F utvecklades av NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, panelkod 16/120) och testades med tre *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-loter (tre replikat per referenspanelsnivå och reagenslot). Experimentet utfördes av en operatör under tre dagar med hjälp av ett Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument. Överensstämmelsen mellan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-resultaten och konsensusvärdena i referenspanelens bruksanvisningen utvärderades med en vanlig linjär regression (lutning: 1,003, 95 % CI [0,997; 1,010] – intercept: 0,677, 95 % CI [0,212, 1,289]) och Passing-Bablok-regression (lutning: 1,01, 95 % CI [1,00; 1,021] – intercept: 0,00, 95 %CI [-0,02, 0,010]) (bild 22). Överensstämmelse bekräftas, vilket betyder att kitet är lämpligt för att tillhandahålla JAK2 V617F-data i enlighet med andra vanliga diagnoseringstekniker.

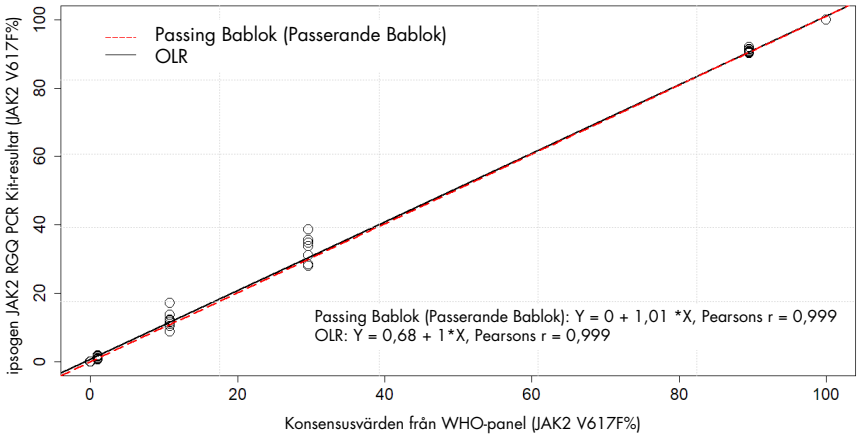

Bild 22. Överensstämmelse mellan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-resultaten och konsensusvärdena från WHO:s internationella referenspanel för Genomik JAK2 V617F (NIBSC, panelkod 16/120). Överensstämmelsen utvärderades med en vanlig linjär regression (OLR, Ordinary Linear Regression) och Passing Bablok-regression. Panelen består av sju*JAK2* V617F-nivåer: 100 %, 89,5 %, 29,6 %, 10,8 %, 1,00 %, 0,03 % och 0 %. WHO-konsensusvärdena avgjordes med hjälp av olika vanligt förekommande tekniker som del av en internationell samarbetsstudie. Referensvärdena för varje JAK2 V617F%-nivå är medelvärden (mer information på https://www.nibsc.org).

Riktighet och noggrannhet

Mätningarnas riktighet är omvänt relaterat till systemmätningsfelet (SE eller bias). Bias beräknades enligt EP09c-riktlinjerna från NCCLS för varje JAK2 V617F%-nivå på referenspanelen för varje reagenslot samt reagensloterna överlag (tabell 14) med hjälp av data från studien som beskrivs ovan. De högsta biasvärdena erhölls från *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-lot 2.

Noggrannheten baseras på närheten av överensstämmelsen mellan testresultat och det godkända referensvärdet (i det här fallet tilldelas värdet på varje JAK2 V617F%-nivå i WHO-panelen). Noggrannhet omfattar både riktighet och precision, och är omvänt proportionell mot det totala felet enligt beräkningen i tabell 14.

Tabell 14. Bias och fel vid mätning

Referensvärde från WHO-panel ***Ampoule code***	*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-lot	Bias (SE) per lot [95 % CI]	Bias (SE) övergripande [95 % CI]	Totalt antal fel (exakthet)
15/172 0 %	1	0,000 [Ej tillämpligt]	0,001 [-0,001, 0,004]	0,010
	2	0,003 [-0,011, 0,018]		
	3	0,000 [Ej tillämpligt]		
15/170 0,03 %	1	-0,010 [-0,053, 0,033]	0,003 [-0,021, 0,028]	0,024
	2	0,020 [-0,094, 0,134]		
	3	0,000 [-0,075, 0,075]		
15/168 1,00 %	1	-0,310 [-0,621, 0,001]	0,066 [-0,276, 0,407]	0,363
	2	0,617 [0,016, 1,217]		
	3	-0,110 [-0,261, 0,041]		
15/166 10,8 %	1	-0,183 [-4,523, 4,156]	1,207 [-0,630, 3,043]	2,521
	2	3,600 [-2,670, 9,870]		
	3	0,203 [-1,387, 1,793]		

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 14. Bias och fel vid mätning (forts.)

WHO-panel ***Ampullkod*** Referensvärde	*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-lot	Bias (SE) per lot [95 % CI]	Bias (SE) övergripande [95 % CI]	Totalt antal fel (exakthet)
15/244 29,6 %	1	0,970 [-8,238, 10,178]	2,874 [0,016, 5,733]	5,589
	2	6,347 [0,141, 12,552]		
	3	1,307 [-5,767, 8,381]		
15/246 89,5 %	1	1,000 [-0,295, 2,295]	1,381 [0,889, 1,873]	≤ 5,622
	2	1,783 [-0,316, 3,883]		
	3	1,360 [0,270, 2,450]		
15/164 100 %	1	-0,017 [-0,031, -0,002]	-0,017 [-0,021, -0,013]	≤ 5,450
	2	-0,020 [Ej tillämpligt]		
	3	-0,013 [-0,028, 0,001]		

SE: Systematiska fel eller bias dvs. skillnaden mellan genomsnittet av de individuella mätningarna med ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit ($\overline{V}_{\mathbf{JAK2\ Kit}}$) och konsensusvärdet i WHO:s referenspanel ($V_{\mathbf{Ref}}$).

$$\text{SE}\ (\%) = \frac{\overline{V}_{\text{JAK2 Kit}} - V_{\text{Ref}}}{V_{\text{Ref}}} \times 100$$

Totalt fel (Total Error, TE) beräknas som $TE = \sqrt{s^2 + SE^2}$, där s är standardavvikelsen (slumpmässigt fel).

95 % KI: 95 % konfidensintervall

N/A: ej tillämpligt

Analytisk noggrannhet

Syftet med den här studien var att validera den analytiska noggrannheten för *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit under vanlig användning med kliniska prover från deltagare med misstänkta myeloproliferativa neoplasmer. Studien utfördes på gDNA-prov som extraherats från totalt 473 prov: 276 med misstänkt PV, 98 med ET och 99 med PMF. JAK2 V617F-status för de patientprover som erhållits med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit jämfördes med JAK2 V617F-status som erhållits med referensmetoden för bestämning av JAK2-status, dvs. en oberoende validerad bidirektionell sekvensering (BDS). Eftersom LoD för *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit är 0,042 % av JAK2 V617F, är JAK2 V617F-status för ett patientprov testat med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit positivt över eller vid den här gränsen och negativt under den. Av 473 prover var 22 JAK2-positiva med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit samtidigt som de var negativa med BDS.

Total överensstämmelse är 95,35 % (451/473 deltagare, 95 % CI: 93,04 %, 97,06 %). Den positiva överensstämmelsen var 100 % (165/165 deltagare, 95 % CI: 97,79 %, 100 %) och den negativa överensstämmelsen var 92,86 % (286/308 deltagare, 95 % CI: 89,39 %, 95,47 %). Resultaten visas i tabell 15.

Tabell 15. Överensstämmelse mellan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit och bidirektionell Sanger-sekvensering i MPN-populationen (kombinerade ET-, PMF- och PV-populationer)

		Bidirektionell Sanger-sekvensering		
		JAK2 V617F-positiv	**JAK2 V617F-negativ**	**Totalt**
ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit	JAK2 V617F-positiv	165	22	187
	JAK2 V617F-negativ	0	286	286
	Totalt	165	308	473

Bedömning av studieresultat för analytisk noggrannhet hos MPN-kohorter

Överensstämmelsen mellan erhållna resultat för JAK2 V617F-mutationen med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit och med Sanger-sekvensering (BDS) hos deltagare med ET, PMF och PV anges separat:

- Total överensstämmelse för ET är 89,8 % (88/98 deltagare, 95 % CI: 82,03–95,0 %), positiv överensstämmelse är 100 % (43/43 deltagare, 95 % CI: 91,78–100 %) negativ överensstämmelse är 81,82 % (45/55 deltagare, 95 % CI: 69,1–90,92 %).
- Total överensstämmelse för PMF är 93,94 % (93/99 deltagare, 95 % CI: 87,27–97,74 %), positiv överensstämmelse är 100 % (51/51 deltagare, 95 % CI: 93,02–100 %) negativ överensstämmelse är 87,5 % (42/48 deltagare, 95 % CI: 74,75–95,27 %).
- Total överensstämmelse för PV är 97,83 % (270/276 deltagare, 95 % CI: 95,33–99,2 %), positiv överensstämmelse är 100 % (71/71 deltagare, 95 % CI: 94,94–100 %) negativ överensstämmelse är 97,07 % (199/205 deltagare, 95 % CI: 93,74–98,92 %).

Proverna som gav avvikande resultat verkade ha mutationsnivåer under detektionskapaciteten hos BDS (runt 10 %). Eftersom Sanger-sekvensering inte är lika känslig som *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit som kan rapportera värden så låga som 0,042 % av JAK2 V617F (dvs. LoD-värdet), utfördes en separat studie med en validerad nästa generations sekvenseringsmetod (NGS) för att detektera JAK2 V617F-allelen hos de 15/22 avvikande proverna (nio ET, fem PMF och en PV), samt ett slumpmässigt urval av 22 JAK2 V617F-positivt and -negativt överensstämmande prov. JAK2 V617F-status för patientproverna bestämdes med NGS-metoden baserat på dess gränsen för dess analytiska känslighet (dvs. mellan 1 % och 2 % av JAK2 V617F). Därmed var JAK2 V617F-status för ett patientprov positivt om JAK2 V617F-mutationen detekterades av NGS-metoden och omvänt så var JAK2 V617F-status negativ om JAK2 V617F-mutationen inte detekterades.

Alla 15 avvikande prover testade positiva med NGS, vilket överensstämmer med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Alla överensstämmande prov testade likadant med NGS i överensstämmelse med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit och BDS. De 7 andra proven ansågs avvikande eftersom NGS-data inte fanns tillgängliga för dessa prover.

Slutsats från studien om analytisk noggrannhet

Efter omklassificering av de avvikande fallen med NGS-resultaten, uppvisade *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit 98,3 % i noggrannhet för detektion av JAK2 V617F-allelen i prover från MPN-deltagare med JAK2 V617F-nivåer ≥0,042 % (dvs. LoD-värdet).

Klinisk prestanda

Den kliniska prestandan för *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit vid diagnos av PV bedömdes under en multicenter-, internationell, prospektiv, interventionsstudie.

Syftet med studien var att demonstrera noggrannheten för *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit för detektion av V617F-mutation hos deltagare med misstänkt PV. Referensen för bestämning av JAK2-status var en oberoende validerad bidirektionell sekvenseringsmetod (BDS).

Detektion av JAK2 V617F-mutationen har först introducerats för referenskriterierna hos WHO 2008 för diagnos av BCR-ABL-negativ MPN och förekomst av den här mutationen är ett huvudkriterium för bekräftad diagnos (17.)

Förekomsten av JAK2 V617F är ett av de två större diagnostiska kriterierna (PV är bekräftat om två större och ett mindre eller om det första större och två mindre kriterier förekommer enligt WHO 2008*; (för information, se referens 17)

Syftet var att utvärdera specificitet, känslighet, positivt prediktivt värde (PPV), negativt prediktivt värde (NPV) och sannolikhetskvot för diagnoser som fastställts av de diagnostiska kriterierna från WHO från 2008* via JAK2 V617F-statusbedömning med antingen *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit med en cutoff på 0,042 % för positivitet (dvs. kitets LoD) eller BDS.

Studien utfördes på nio studieplatser i USA (sju registrerade deltagare), 12 studieplatser i Frankrike (alla 12 registrerade deltagare) och nio studieplatser i Italien (fem registrerade deltagare). Deltagarna screenades och valdes ut baserat på inkluderingskriterier som indikerade en diagnos med PV. Alla registrerade deltagare fick blodprover med både *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit och referenstestet, bidirektionell sekvensering (BDS) för bestämning av JAK2 V617F- och JAK2 exon 12-status. Deltagare med kliniska drag kompatibla med diagnos av PV (inklusive ökade nivåer av hemoglobin och minskade nivåer av erytropoietin [EPO]) men med negativ bestämning av JAK2 V617F och exon 12 av BDS och deltagare med positiv bestämning av JAK2 V617F och exon 12 av BDS samt normala eller höga EPO-nivåer skulle genomgå en benmärgsbiopsi med histologisk och cytogenetisk analys, som det krävs enligt den diagnostiska algoritmen 2008 WHO för myeloproliferativa sjukdomar. Den slutliga diagnosen (PV- eller icke-PV) fastställdes baserat på resultaten från de icke-utredande studieprocedurerna (dvs. WHO-kriterierna från 2008 med bestämning av JAK2-mutation med BDS-referensanalysen).

Totalt 216 deltagare definierade som den utvärderingsbara populationen innefattade alla deltagare som uppfyllde både de kliniska screeningkriterierna och de analytiska kriterierna med BDS-referensanalysen. Ytterligare 67 deltagare var inte utvärderingsbara av de skäl som beskrivs i Tabell 16 (några deltagare var inte utvärderingsbara av mer än ett skäl).

* Eftersom studien om klinisk prestanda initierades innan uppdateringen 2016 av WHO:s diagnostiska kriterier, användes de diagnostiska kriterierna från 2008 för att utföra den kliniska prestandastudien.

Tabell 16. Orsak till undantag i den registrerade populationen

Orsak	Antal deltagare
Undantagskriterierna har inte inkluderats	9
EPO-resultat saknas	22
BM-biopsi saknas (om sådan behövs vid PV-diagnos)	26
Positivt JAK2 V617F av BDS och serum-EPO inom normala gränser	15
Positivt JAK2 Exon 12 av BDS och serum-EPO inom normala gränser	1
Negativt JAK2 V617F av BDS och serum-EPO är onormalt lågt	10
Patienterna slutförde inte studien och/eller saknade slutgiltig PV-diagnos	15

För den här studien utfördes totalt 221 bedömningar av JAK2 V617F-status (inklusive fem upprepade tester) med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet (Tabell 17, Tabell 18).

Tabell 17. Sammanfattning av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-testresultat (utvärderingsbar population)

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit	Total (N=216)
JAK2 V617F-positiv (≥ LoD dvs 0,042 %)	54
JAK2 V617F-negativ (< LoD dvs 0,042 %)	162

Tabell 18. Sammanfattning av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-testresultat – JAK2 V617F, positiv population (i utvärderingsbar population)

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit	Total (N=54)
JAK2 %MT erhållet medelvärde	51,54
JAK2 %MT erhållet minimivärde	0,14
JAK2 %MT erhållet maxvärde	93,43

N: Antal prover **JAK2 %MT**: Procentandel av JAK2-mutation

Bedömning av validerade studieresultat: resultatdata

Jämförelse av slutliga PV- och icke-PV-diagnoser demonstrerade att de två diagnosmetoderna var samstämmiga: 94,6 % av deltagarna (53/56 deltagare) diagnosticerade med PV av utredaren diagnosticerades även med PV med hjälp av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit och diagnoskriterierna från WHO. På liknande sätt diagnosticerades 95,6 % av deltagarna (153/160 deltagare) som diagnosticerats som icke-PV av utredaren även som icke-PV med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit och de diagnostiska kriterierna från WHO (Tabell 19, Tabell 20).

Mutationsstatus för JAK2 V617F och exon 12 med BDS samt JAK2 V617F med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit sammanfattas i Tabell 19. En jämförelse av PV- och icke-PV-diagnoser fastställd med varje testmetod anges i Tabell 19.

Tabell 19. Mutationsstatus (JAK2 V617F med bidirektionell sekvensering, JAK2 exon 12 med bidirektionell sekvensering och *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit) efter PV-status (utvärderingsbar population)

Variable (Varierande)	PV (N=56)	Icke-PV (N=160)	Total (N=216)
JAK2 V617F-mutationstatus av BDS			
Positivt	48 (85,7 %)	1 (0,6 %)	49 (22,7 %)
Negativt	8 (14,3 %)	159 (99,4 %)	167 (77,3 %)
JAK2 exon 12-mutationstatus av BDS			
Positivt	3 (5,4 %)	0	3 (1,4 %)
Negativt	53 (94,6 %)	160 (100,0 %)	213 (98,6 %)
Status på *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit			
Positivt	48 (85,7 %)	6 (3,8 %)	54 (25 %)
Negativt	8 (14,3 %)	154 (96,3 %)	162 (75 %)

N: Antal patienter som diagnosticerats av utredaren (utvärderad population).
För varje mutationsstatus uttrycks antalet patienter som ett absolut antal och som en procentandel av den utvärderade populationen (inom parentes).

Tabell 20. Slutlig PV-diagnos baserad på utredarens åsikt grundad på bidirektionell testning och Världshälsoorganisationens kriterier från 2008 med hjälp av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit

	Slutgiltig diagnos ställd av utredare baserat på WHO-kriterier i kombination med JAK2-bedömning utförd av BDS		
Slutlig diagnos baserat på WHO-kriterierna tillsammans med JAK2-bedömning utförd med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit	**PV (N=56)**	**Icke-PV (N=160)**	**Totalt (N=216)**
PV	53 (94,6 %)	1 (0,6 %)	54 (25 %)
Icke-PV	1 (1,8 %)	153 (95,6 %)	154 (71,3 %)
Ofullständig	2 (3,6 %)	6 (3,8 %)	8 (3,7 %)

N: Antal patienter som diagnosticerats av utredaren (utvärderad population)
Antal uttrycks som ett absolut antal och som en procentandel av den utvärderade populationen (inom parentes).

Fall med ofullständiga resultat

Tre deltagare var vildtyp för JAK2 V617F (både med BDS och *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit), utöver att ha låga serum EPO-koncentrationer och en ofullständig benmärgshistologi (två diagnosticerades som PV av utredaren och en som icke-PV). Fem deltagare var JAK2 V617F-vildtyp för BDS och positiva med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit och ingen benmärgsbiopsi utfördes (alla fem diagnosticerades som icke-PV av utredaren). Trots frånvaron av eller ofullständig benmärgshistologi inkluderades dessa åtta fall i beräkningen av specificitet och känslighet (Tabell 21) som avvikande.

Avvikande fall

För två deltagare skilde sig utredarens diagnos från den som erhölls med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit inom de diagnostiska kriterierna från WHO. En deltagare hade serum EPO-nivåer inom normalt intervall (vid 16,5 IU/L) och ingen JAK2 V617F- eller exon 12-mutation. Deltagaren diagnosticerades dock att ha PV enligt utredarens åsikt. En deltagare hade serum EPO-nivåer under normalt intervall och en JAK2 V617F-mutation enligt BDS, men diagnosticerades som icke-PV enligt utredarens åsikt. Enligt protokollet skulle utredarens diagnos strikt ha följt de diagnostiska kriterierna från WHO från 2008. I dessa två avvikande fall använde utredarna dock kliniska erfarenhet vid tolkning av algoritmen.

Överlag, som det sammanfattas i Tabell 21, var känsligheten för PV-diagnos med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit 94,64 % (53/56 deltagare; 95 % CI: 85,13 %, 98,88 %), vilket indikerar att den här analysen förväntas detektera PV hos det stora flertalet patienter med sjukdomen. På liknande sätt var specificiteten för PV-diagnos med analysen 95,62 % (153/160 deltagare; 95 % CI: 91,19 %, 98,22 %), vilket indikerar att den även förväntas utesluta PV hos det stora flertalet patienter utan PV.

Dessutom beräknades positivt prediktivt värde (PPV) och negativt prediktivt värde (NPV), PPV för kitet var 88,33 % (53/60 deltagare; 95 % CI: 77,27 %, 93,57 %) och NPV var 98,08 % (153/156 deltagare; 95 % CI: 94,8%, 99,4 %).

Tabell 21. Analys av känslighet, specificitet, PPV och NPV (utvärderingsbar population)

Variable (Varierande)	Uppskattning (%)	Lägre 95 % konfidensgräns (%)	Högre 95 % konfidensgräns (%)
Känslighet	94,64	85,13	98,88
Specificitet	95,62	91,19	98,22
PPV	88,33	77,27	93,57
NPV	98,08	94,8	99,4

Sannolikhetskvoten för ett negativt test med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, för PV-diagnos, inom de diagnostiska kriterierna från WHO var 21,6 (95 % CI; 10,44, 44,71), vilket indikerar att resultatet JAK2 V617F-positiv är mer sannolikt för patienter med PV än med de utan PV.

Sannolikhetskvoten för ett positivt test med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, för PV-diagnos, inom de diagnostiska kriterierna från WHO var 0,06 (95 % CI; 0,02, 0,18), vilket indikerar att resultatet JAK2 V617F-negativ är mindre sannolikt för patienter med PV än med de utan PV.

Slutsats av den kliniska studien

Följande slutsatser kan dras baserat på analyserna:

- Känsligheten var 94,64 % (95 % CI; 85,13 %, 98,88 %) vilket indikerar att *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit inom de diagnostiska kriterierna från WHO förväntas detektera PV hos det stora flertalet patienter med sjukdomen.
- Specificiteten för PV-diagnos med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit inom de diagnostiska kriterierna från WHO var 95,62 % (95 % CI; 91,19 %, 98,22 %), vilket indikerar att den även förväntas utesluta PV hos det stora flertalet patienter utan PV.
- Med hjälp av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit inom de diagnostiska kriterierna från WHO var PPV 88,33 % (95 % CI; 77,27 %, 93,57 %)* och NPV var 98,08 % (95 % CI; 94,8 %, 99,4 %).
- Sannolikhetskvoten för ett negativt test med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, för PV-diagnos, inom de diagnostiska kriterierna från WHO var 21,61 (95 % CI; 10,44, 44,71), vilket indikerar att resultatet JAK2 V617F-positiv är mer sannolikt för patienter med PV än med de utan PV.
- Sannolikhetskvoten för ett positivt test med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, för PV-diagnos, inom de diagnostiska kriterierna från WHO var 0,06 (95 % CI; 0,02, 0,18), vilket indikerar att resultatet JAK2 V617F-negativ är mycket mindre sannolikt för patienter med PV än med de utan PV.

* PPV är avhängigt av prevalensen. Eftersom prevalensen var låg i studiepopulationen och känslighet och specificitet är oberoende av prevalens så är känslighet och specificitet mer relevanta.

Säkerhets- och prestandasammanfattning

Sammanfattningen av avsnittet säkerhet och prestanda kan laddas ner från produkthemsidan för *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit: **resources.qiagen.com/674623**. Du hittar den även på EUDAMED-webbplatsen.

Bortskaffning

- Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.
- Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. Prover är potentiellt farliga och måste hanteras som smittfarligt material.
- Kassera de provrör, plattor och avfall som används vid DNA-extraktion i enlighet med lokala säkerhetsregler.
- De rör på remsa som används för qPCR-protokollet måste kassera i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.

Referenser

1. James C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 434, 1144.

2. Levine R.L., et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell *7*, 387.

3. Kralovics R., et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N. Engl. J. Med. 352, 1779.

4. Baxter E.J., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 36, 1054.

5. Vannuchi AM, Barbui T, Cervantes F, et al. Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2015;26 Suppl 5:v85-99.

6. Tefferi A., et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. Nat. Rev. Clin. Oncol. 6, 627.

7. Quintás-Cardama A. (2013) The role of Janus kinase 2 (JAK2) in myeloproliferative neoplasms: therapeutic implications. Leuk Res. Apr;37(4):465-72.

8. Arber DA., et al. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood; 127:2391–405.

9. Barbui T. et al. (2011) Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. J Clin Oncol 29:761–70.

10. Barosi G., et al. (2013) Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus project. Blood; 121:4778–81

11. Tefferi A., et al. (2013) Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report. Blood; 122:1395–8.

12. NCCN. NCCN Guidelines for Patients® | Myeloproliferative Neoplasms (2019.2 revision), 2nd ed.; 2019.

13. Langabeer SE, et al. (2015) Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms. Eur J Haematol; 95:270–9.

14. Lippert E., et al. (2014) Clinical and biological characterization of patients with low (0.1-2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. Haematologica. 99, e98.

15. Jovanovic J., et al (2013) Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2V617F associated myeloproliferative neoplasms: A joint European LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet (COST action BM0902) study. Leukemia 27, 2032

16. National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT_008413.

17. Tefferi A. and Vardiman J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia, 22, 14.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på **www.qiagen.com/Support** (gå till **www.qiagen.com** för att få kontaktinformation).

Information om felsökning av extraktionskiten QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) och QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) finns i respektive handbok. Information om felsökning av Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 finns i *användarhandboken för Rotor-Gene AssayManager v. 2.1 Core Application*.

Kommentarer och förslag	
Automatisk extraktion	
a) Prov flaggat som ”unclear” (ej tydligt)	Detta kan bero på en paus under extraktionskörningen. Om extraktionskörningen slutförts, fortsätt till mätning av kvot och koncentration optisk densitet (OD). Om inte, upprepa extraktionskörningen.
b) Prov flaggat som ”unprocessed” (ej bearbetat)	Detta beror på ett initialt fel i provvolymen. Verifiera blodvolymen genom pipettering. Om volymen är för låg, öka den så att provet är 300 µL och starta om körningen.
c) Prov flaggat som ”invalid” (ogiltigt)	Ett fel uppstod under extraktionskörningen. Upprepa extraktionssteget för det här provet.

Kommentarer och förslag	
d) Temperaturfel vid nedkylningsblocket	Ett felmeddelande om nedkylningstemperaturen som visas i slutet av körningen innebär att proverna har förvarats i rumstemperatur (15–25 °C) från slutet av extraktionskörningen. Om proverna har förvarats i rumstemperatur < 12 timmar ska kvaliteten på genomiskt DNA inte ha ändrats och genomiskt DNA kan kvantifieras. Om det gått längre tid än 12 timmar kan proverna med genomiskt DNA ha försämrats. Om så är fallet, upprepa extraktionen.
e) Fel vid borttagning av elueringsplattan	I slutet av körningen kan ett felmeddelande visas om elueringsplattan tagits bort utan att den aktuella åtgärden kontrollerats i fönstret. Detta kan åtgärdas genom att markera den aktuella kryssrutan.

Allmän hantering för bedömning av JAK2-mutationsstatus med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit

Totala antalet kopior överensstämmer inte och motsvarande prov är ogiltigt: amplifieringen är för låg

a) Kontrollera A_{260}/A_{280}-kvoten	Om den är < 1,7 ska en ny DNA-extraktion utföras.
b) Kontrollera DNA-koncentrationen	*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit är optimerat för en koncentration på 10 ng/µL. Om DNA-koncentrationen inte ligger på den nivån, diluera eller extrahera om DNA från helblod.
c) Om båda parametrarna överensstämmer kan pipetteringsvolymerna vara felaktiga	Kontrollera och kalibrera om pipetterna innan du utför qPCR-steget på nytt.

Kommentarer och förslag

Körningskontroll misslyckas på en QS-standard

a) Felvänd flaska b) Felvändning under distribution c) Korskontaminering d) Standarden delvis försämrad e) PCR-reagenser delvis försämrade f) Icke-specifik amplifiering	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Byt ut alla kritiska reagenser och upprepa experimentet med nya alikvoter. Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika överföring av smitta. Förvara kitets innehåll i -30 till -15 °C och håll reaktionsmixarna skyddade mot ljus. Undvik att tina och frysa upprepade gånger.

Ingen eller låg signal för en standard

a) Homogenitetsproblem b) Användning av samma reaktionsmix för WT och MT QS	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Upprepa PCR-körningen.

Kontroll utan mall (No Template Control, NTC) med vatten uppvisar positiv amplifiering

a) Korskontaminering b) Reagenskontaminering c) Felvänt rör på remsa (rör med *JAK2 V617F* positiv mall i NTC-position) d) Försämrat sökfragment	Byt ut alla kritiska reagenser. Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika överföring av smitta. Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Håll reaktionsmixarna skyddade mot ljus. Leta efter falskt positivt resultat på fluorescenskurvan.

Kommentarer och förslag

Ingen signal, inte ens i standardkontroller

Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Upprepa PCR-körningen.

Frånvarande eller låga signaler i prover för IC och/eller totalt antal kopior (TCN) under giltighetsintervallet, men körningskontrollerna är giltiga

Effekter av hämmare i provmaterialet, orsakat av otillräcklig rening	Kontrollera alltid DNA-kvaliteten genom att mäta A_{260}/A_{280} kvot och koncentration innan du startar. Upprepa beredning av DNA.

Vildtyp-kontroll (Wild-Type Control, WTC) är positiv, men mutantkontroll (Mutant Control, MTC) är inte tillräckligt positiv

Överföring av smitta	Byt ut alla kritiska reagenser. Upprepa experimentet med nya alikvoter av alla reagenser. Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika överföring av smitta. Se till att spetsarna byts mellan pipetteringar av olika reagenser.

Vildtypskontroll (Wild-Type Control, WTC) amplifierad med MT-reaktionsmix (i stället för WT-reaktionsmix) och mutantkontroll (Mutant Control, MTC) amplifierad med WT-reaktionsmix (i stället för MT-reaktionsmix)

a) Korskontaminering b) Reagenskontaminering c) Felvänt rör (rör som innehåller WTC i MTC-position och viceversa)	Byt ut alla kritiska reagenser. Upprepa experimentet med nya alikvoter av alla reagenser. Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika överföring av smitta. Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.

Kommentarer och förslag

Inverterad detektion av positiv kontroll

a) Korskontaminering	Byt ut alla kritiska reagenser och upprepa experimentet med nya alikvoter. Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika överföring av smitta.
b) Omvänd distribution av reaktionsmix i rör eller i förmix.	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.

Ingen signal för ett prov eller en kontroll, inte ens för internkontrollen

a) Reaktionsmix eller en av dess komponenter (t.ex. Taq-polymeras) har ej tillsatts	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Om internkontrollen inte är amplifierad har reaktionsmixen inte lagts till eller är försämrad.
b) Försämrad reaktionsmix	Upprepa qPCR-steget med ny reaktionsmix.

Symboler

Nedanstående symboler finns i användningsinstruktionerna eller på förpackningar och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
	Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner
	Utgångsdatum
	Den här produkten uppfyller kraven i Europeisk Regel 2017/746 för in vitro-diagnostiska medicintekniska enheter.
	In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer (dvs. komponentetikett)
	GSI-artikelnummer
	Unik enhetsidentifierare
	Innehåller
	Komponent
	Antal

Symbol	Symbolförklaring
Rn	R betyder revidering av bruksanvisningen och n är revisionsnumret
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
	Se anvisningarna i bruksanvisningen som hämtas på **resources.qiagen.com/674623**
	Skyddas mot ljus
	Iakttag försiktighet, läs medföljande dokumentation

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit	För 24 reaktioner: Vildtyp JAK2-kontroll, JAK2 V617F-kontroll, JAK2 WT Quant-standarder, JAK2 MT Quant-standarder, JAK2 WT-reaktionsmix, JAK2 MT-reaktionsmix, Taq DNA-polymeras, TE-buffert för spädning, vatten för NTC	674623
Relaterade produkter		
Rotor-Gene Q MDx – för IVD-validerad real-time PCR-analys i kliniska tillämpningar		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med fem kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår ej	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Programvara för rutintestning i kombination med Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Programvara med separat licens för installation på en dator	9025620

Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanalspipett i 72 x 0,1 mL rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 remsor med fyra rör och lock för 10 000 reaktioner	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	För 50 beredningar: QIAamp Mini Spin Columns, buffertar, reagenser, rör, VacConnectors	61104
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit	För 192 beredningar på vardera 200 µL: Inkluderar två reagenskassetter och enzymrack och tillbehör.	937236

QIAsymphony SP and accessories

QIAsymphony SP System	QIAsymphony provberedningsmodul: inkluderar installation och utbildning, 1 års garanti på delar och arbete	9001751
QIAsymphony SP	QIAsymphony provberedningsmodul: inkluderar 1 års garanti på delar och arbete	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-brunnars provberedningskassetter för användning med QIAsymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers för användning med QIAsymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Filterspetsar för engångsbruk, i ställ (8 × 128). För användning med instrumenten QIAcube® och QIAsymphony SP/AS	990332

Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Filterspetsar för engångsbruk, i ställ (8 × 128). För användning med QIAsymphony SP/AS-instrument	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Icke-sterila polypropylenrör (0,85 mL maximal kapacitet, mindre än 0,7 mL förvaringskapacitet, 0,4 mL elueringskapacitet); 2 304 i ställ med 96, inkluderar lockremsor	19588
RNase A (17,500 U)	2,5 mL (100 mg/mL; 7 000 enheter/mL, lösning)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 mL lyseringsbuffert för 1 000 beredningar	19076

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i bruksanvisningen till respektive QIAGEN-kit. Bruksanvisningar för QIAGEN-kit finns på **www.qiagen.com** eller kan beställas från QIAGENs tekniska service eller din lokala återförsäljare.

Dokumentrevisioner

Revision	Beskrivning
R1, juli 2022	Startversion

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Begränsat licensavtal för *ipsogen*® JAK2 RGQ PCR Kit

Användning av denna produkt innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här bruksanvisningen och får endast användas med komponenterna som ingår i panelen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna panel med komponenter som inte ingår i denna panel förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här bruksanvisningen och ytterligare protokoll som finns på **www.qiagen.com**. Vissa av dessa ytterligare protokoll har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. Dessa protokoll har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att denna panel och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Panelen och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av panelen godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser panelen och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se **www.qiagen.com**.

Varumärken: QIAGEN®, *ipsogen*® QIAamp®, QIAcube®, QIAsymphony®, HotStarTaq®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co). Registrerade namn, varumärken med mera som används i detta dokument ska inte anses som oskyddade enligt lag, även om de inte uttryckligen anges som lagstadgade.

07/ 2022 HB-2872-001 1123592 © 2022 QIAGEN, med ensamrätt.

HB-2872-001