



Julho de 2022

Instruções de utilização do *ipsogen*[®] JAK2 RGQ PCR Kit



Versão 2



Para utilização em diagnóstico in vitro

Para utilização com o instrumento Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



0197



674623



QIAGEN, GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA



1123592PT

Índice

Utilização prevista	6
Utilizador previsto	6
Descrição e princípio	7
Resumo e explicação	7
Princípio do procedimento.....	11
Materiais fornecidos	15
Conteúdo do kit	15
Conteúdo do kit (cont.).....	16
Componentes do kit.....	17
Materiais necessários, mas não fornecidos	19
Consumíveis e reagentes para extração manual de ADN.....	19
Consumíveis e reagentes para extração automatizada de ADN.....	19
Consumíveis e reagentes para PCR	19
Equipamento.....	20
Equipamento para preparação da amostra	20
Equipamento para PCR em tempo real.....	20
Avisos e precauções	21
Informações de segurança.....	21
Informações para casos de emergência	21
Precauções	22
Armazenamento e manuseamento de reagentes.....	24
Condições de expedição	24

Condições de armazenamento	24
Estabilidade na utilização	25
Armazenamento e manuseamento de amostras	26
Amostras de sangue total	26
Amostras de ADN genómico	26
Protocolo: extração e preparação de ADN genómico a partir de sangue total	27
Extração manual de ADN genómico utilizando o QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	27
Extração automatizada de ADN genómico utilizando o QIASymphony DSP DNA Mini Kit	31
Qualificação e quantificação de ADN	36
Normalização de amostras de ADN genómico	37
Protocolo: qPCR no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	38
Instalar o software principal do Rotor-Gene AssayManager v2.1	39
Instalar o Gamma Plug-in e importar perfil de ensaio	40
Processamento de amostras no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM com rotor de 72 tubos	43
qPCR no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM com rotor de 72 tubos	46
Interpretação de resultados	60
Limitações	67
Características de desempenho	69
Desempenho analítico	69
Teste do painel de referência internacional da OMS para JAK2 V617F genómica (NIBSC, código do painel 16/120)	77
Desempenho clínico	84

Resumo de segurança e desempenho	92
Eliminação.....	93
Referências	94
Guia de resolução de problemas.....	96
Símbolos	102
Informações para encomendas.....	104
Histórico de revisões do documento.....	107

Utilização prevista

O *ipsogen*® JAK2 RGQ PCR Kit é um ensaio de PCR quantitativo in vitro que se destina à detecção e quantificação da mutação JAK2 V617F/G1849T em ADN genómico extraído de sangue total periférico humano anticoagulado com EDTA 2K. Os resultados obtidos com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit destinam-se a ser utilizados como um auxiliar na avaliação de suspeita de neoplasia mieloproliferativa (NMP) cromossoma Filadélfia (Ph) negativa e na monitorização de doenças moleculares em pacientes com NMP. Todos os resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados em conjunto com outros resultados clínico-patológicos.

O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit destina-se a ser utilizado apenas com o instrumento QIAGEN Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM e outros componentes de fluxo de trabalho validados, conforme descrito nas instruções de utilização. O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit não é um dispositivo automatizado; no entanto, a análise é assistida por um software dedicado.

O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit destina-se a ser utilizado em diagnóstico in vitro.

Utilizador previsto

Este kit destina-se a utilização profissional.

O produto deve ser utilizado apenas por profissionais com formação específica, especializados em técnicas de biologia molecular e familiarizados com esta tecnologia. O procedimento do dispositivo destina-se a ser implementado num ambiente laboratorial de biologia molecular.

Descrição e princípio

Resumo e explicação

Uma mutação somática recorrente, *V617F*, que afeta o gene tirosina quinase Janus 2 (*JAK2*), foi identificada em 2005 (1–4), levando a uma descoberta muito importante para a compreensão, classificação e diagnóstico de NMP. *JAK2* é uma molécula sinalizadora intracelular essencial para várias citocinas, incluindo a eritropoietina.

A mutação *JAK2 V617F* é detetada em >95% dos pacientes com policitemia vera (PV) e em aproximadamente 60% dos pacientes com trombocitopenia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP).(5) Também se detetou *JAK2 V617F* em alguns casos raros de leucemia mielomonocítica crónica, síndrome mielodisplásica (SMD), mastocitose sistémica, e leucemia neutrofílica crónica, mas em 0% de casos de leucemia mieloide crónica (LMC).(6)

A mutação *JAK2 V617F* corresponde à alteração de um único nucleótido, o nucleótido 1849 de *JAK2* no exão 14, causando uma substituição única de valina (V) por fenilalanina (F) na posição 617 da proteína (domínio JH2). O gene *JAK2* codifica uma tirosina cinase envolvida na sinalização do recetor de citocinas através da via STAT. Quando ativado constitutivamente, mais frequentemente através da mutação *JAK2 V617F*, o resultado é a transformação de progenitores eritroides, hipersensibilidade à eritropoietina e ativação de vias de sinalização a jusante. Além disso, coloca-se a hipótese de que o *JAK2* desregulado promove expressão oncogene, recombinação mitótica e instabilidade genética.(7)

Tradicionalmente, o diagnóstico de NMP era baseado em critérios clínicos citogenéticos e histológicos da medula óssea. A descoberta de um marcador molecular específico da doença resultou na simplificação do processo e num aumento da exatidão do diagnóstico. A deteção da mutação *JAK2 V617F* faz parte dos critérios de referência de 2016 da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico de NMP BCR-ABL negativas (8) (Tabela 1), e a presença desta mutação é um critério muito importante para a confirmação do diagnóstico.

Tabela 1. Critérios da OMS para o diagnóstico de NMP

Critérios para um diagnóstico de PV

- | | |
|-----------------|--|
| Critérios major | <ol style="list-style-type: none">1. Hemoglobina (Hgb) >16,5 g/dL (homens) ou >16,0 g/dL (mulheres) ou hematócrito >49% (homens) ou >48% (mulheres), ou aumento do volume de glóbulos vermelhos >25% acima do valor médio normal previsto.2. Biopsia de medula óssea (MO) apresentando hiperplasticidade para idade com crescimento de três linhagens (panmielose), incluindo proliferação proeminente de eritrócitos, granulócitos e megacariócitos, com megacariócitos pleomórficos maduros (diferenças de tamanho)3. Presença de mutação <i>JAK2V617F</i> ou exão 12 de <i>JAK2</i> |
|-----------------|--|

Critérios minor	Nível de eritropoietina sérica abaixo do normal
-----------------	---

O diagnóstico de PV requer o cumprimento dos 3 critérios major ou dos 2 primeiros critérios major e do critério minor.†

† O critério número 2 (biopsia da MO) pode não ser obrigatório em casos de eritrocitose absoluta sustentada: níveis de hemoglobina >18,5 g/dL em homens (hematócrito, 55,5%) ou >16,5 g/dL em mulheres (hematócrito, 49,5%) se o critério major 3 e o critério minor estiverem presentes. Contudo, só é possível detectar mielofibrose inicial (presente em até 20% dos pacientes) através da realização de uma biopsia da MO; esta descoberta pode prever uma progressão mais rápida para mielofibrose aberta (MF pós-PV).

Critérios para um diagnóstico de TE

- | | |
|-----------------|--|
| Critérios major | <ol style="list-style-type: none">1. Contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$2. Biopsia da MO apresentando proliferação, principalmente da linhagem de megacariócitos, com aumento do número de megacariócitos aumentados maduros com núcleos hiperlobulados. Nenhum aumento significativo ou "left shift" na granulopoiese ou eritropoiese de neutrófilos e pequeno aumento muito raro (grau 1) de fibras de reticulina3. Incumprimento dos critérios da OMS para LMC <i>BCR-ABL1+</i>, PV, MFP, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mieloides4. Presença de mutação de <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> |
|-----------------|--|

Critérios minor	Presença de um marcador clonal ou ausência de evidência de trombocitose reativa
-----------------	---

O diagnóstico de TE requer o cumprimento dos 4 critérios major ou dos 3 primeiros critérios major e do critério minor.

Critérios para um diagnóstico de pré-MFP

Critérios major	<ol style="list-style-type: none">1. Proliferação de megacariócitos e atipia, sem fibrose de reticulina >grau 1, acompanhadas de celularidade aumentada da MO ajustada por idade, proliferação de granulócitos e frequente eritropoiese reduzida2. Incumprimento dos critérios da OMS para LMC <i>BCR-ABL1</i>⁺, PV, TE, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mielóides3. Presença de mutação de <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> <i>MPL</i> ou, na ausência destas mutações, presença de outro marcador clonal[†] ou ausência de fibrose de reticulina reativa menor da MO[‡]
-----------------	---

Critérios minor	Presença de, pelo menos, 1 das seguintes confirmada em 2 determinações consecutivas: <ol style="list-style-type: none">a.) Anemia não atribuída a uma condição de comorbidadeb.) Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$c.) Esplenomegalia palpáveld.) Lactato desidrogenase (LDH) aumentada acima do limite superior normal do intervalo de referência institucional
-----------------	---

O diagnóstico de pré-MFP requer o cumprimento dos 3 critérios major e, pelo menos, de 1 critério minor.

† Na ausência de qualquer uma das 3 principais mutações clonais, a procura das mutações concomitantes mais frequentes (por exemplo, *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) auxilia na determinação da natureza clonal da doença.

‡ Fibrose de reticulina menor (grau 1) posterior à infecção, doença autoimune ou outras condições inflamatórias crônicas, leucemia de células pilosas ou outras neoplasias linfóides, malignidade metastática ou mielopatias tóxicas (crônicas).

Critérios para um diagnóstico de MFP aberta

Critérios major	1.	Presença de proliferação de megacariócitos e atipia, acompanhada de fibrose de reticulina e/ou de colagénio, graus 2 ou 3
	2.	Incumprimento dos critérios da OMS para TE, PV, LMC <i>BCR-ABL1</i> ⁺ , síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mieloides
	3.	Presença de mutação em <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> ou, na ausência destas mutações, presença de outro marcador clonal [†] ou ausência de mielofibrose reativa [‡]

Critérios minor	Presença de, pelo menos, 1 das seguintes confirmada em 2 determinações consecutivas:	
	a.)	Anemia não atribuída a uma condição de comorbidade
	b.)	Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$
	c.)	Esplenomegalia palpável
	d.)	Lactato desidrogenase (LDH) aumentada acima do limite superior normal do intervalo de referência institucional
	e.)	Leucoeritroblastose

O diagnóstico de MFP aberta requer o cumprimento dos 3 critérios major e, pelo menos, de 1 critério minor

† Na ausência de qualquer uma das 3 principais mutações clonais, a procura das mutações concomitantes mais frequentes (por exemplo, *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) auxilia na determinação da natureza clonal da doença.

‡ Fibrose da MO posterior à infeção, doença autoimune ou outras condições inflamatórias crónicas, leucemia de células pilosas ou outras neoplasias linfoides, malignidade metastática ou mielopatias tóxicas (crónicas).

Nota: LMC: leucemia mieloide crónica; TE: trombocitopenia essencial; MFP: mielofibrose primária; PV: policitemia vera; OMS: Organização Mundial de Saúde

Além disso, a descoberta da mutação *JAK2 V617F* em pacientes com NMP revelou um novo alvo para as terapias. A monitorização de doenças moleculares medindo a carga da mutação *JAK2 V617F* demonstrou ser útil para avaliar a resposta ao tratamento e para prever recaídas em pacientes submetidos a transplante alogénico de células estaminais.(9) Os conceitos de resposta molecular são claramente determinados pelas recomendações mais recentes da European LeukemiaNet (ELN) e do International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) (10, 11), e estão referenciados nas diretrizes

da National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (12) e da European Society of Medical Oncology (ESMO).(5) A resposta molecular completa foi definida como erradicação de uma anomalia molecular preexistente, e a resposta molecular parcial como uma redução $\geq 50\%$ na carga de alelo mutante *JAK2 V617F* (a resposta parcial aplica-se apenas a pacientes com pelo menos 20% de carga de alelo mutante *JAK2 V617F* na linha de base).(10,11)

Desde 2006, estão disponíveis vários métodos baseados essencialmente em técnicas de PCR ou sequenciação, tais como testes desenvolvidos em laboratório para detetar a presença e possivelmente quantificar a *JAK2 V617F*. Estes testes têm um desempenho analítico diferente, principalmente no que se refere a precisão e nível de sensibilidade. Esta diferença pode ter influência na necessidade de efetuar análises de medula óssea, no tempo necessário para estabelecer um diagnóstico final e, possivelmente, no diagnóstico e no desempenho da monitorização de doenças moleculares.

Dada a grande variedade de potenciais frações de alelo mutante *JAK2 V617F* que podem ser encontradas nas NMP (com níveis tão baixos como 1%), os laboratórios são encorajados a oferecer testes à mutação *JAK2 V617F* com elevada sensibilidade analítica. As técnicas adequadas devem possuir um baixo limite de deteção (pelo menos 1% para diagnóstico e pelo menos 0,1% para monitorização de doenças moleculares) e alta reprodutibilidade.(5,13)

Princípio do procedimento

Têm sido propostas várias técnicas diferentes para determinar quantitativamente a proporção de polimorfismos de nucleótido único (PNU) em amostras de ADN. Algumas, tais como as curvas de fusão e a sequenciação, são apenas semiquantitativas. Os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) são os preferidos, devido à sua maior sensibilidade. A utilização de um primer específico de PNU permite a amplificação seletiva do alelo mutante (Mutant, MT) ou de tipo selvagem (Wild-type, WT), que é facilmente detetável com a utilização de um instrumento de qPCR em tempo real. Isto permite uma sensibilidade $< 0,1\%$, que está em linha com o limite de corte de *JAK2* de 1% atualmente aceite utilizado para positividade clínica de diagnóstico e o limite de deteção recomendado da carga de alelo *JAK2 V617F* $\leq 0,1\%$ para efeitos de monitorização de doenças moleculares.(5,13) Contudo, deve ser tido em conta que alguns peritos clínicos consideram a presença de qualquer carga

de *JAK2 V617F* como clinicamente significativa no momento do diagnóstico e, por esse motivo, é necessário um método sensível, como a qPCR.(14) O *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* é baseado nessa técnica.

A utilização de qPCR permite a quantificação exata de produtos da PCR durante a fase exponencial do processo de amplificação por PCR. Os dados quantitativos de PCR podem ser rapidamente obtidos, sem processamento pós-PCR, através da detecção em tempo real de sinais de fluorescência durante e/ou após o ciclo de PCR, reduzindo assim drasticamente o risco de contaminação dos produtos da PCR. Atualmente estão disponíveis três tipos principais de técnicas de qPCR: análise de qPCR, utilizando o corante SYBR® Green I, análise de qPCR utilizando sondas de hidrólise e análise de qPCR utilizando sondas de hibridação.

O ensaio da QIAGEN explora o princípio de hidrólise de oligonucleótidos da qPCR. Durante a PCR, os primers diretos e reversos hibridizam numa sequência específica. Está contido na mesma mistura outro oligonucleótido ligado ao corante. Esta sonda, que consiste num oligonucleótido marcado com um corante repórter 5' e um supressor sem corante 3' a jusante, hibridiza-se numa sequência alvo dentro do produto da PCR. A análise de qPCR com sondas de hidrólise explora a atividade exonuclease 5'→3' da polimerase (*Taq*) de ADN de *Thermus aquaticus*. Quanto a sonda está intacta, a proximidade do corante repórter ao supressor resulta na supressão da fluorescência do corante repórter, principalmente por transferência de energia por ressonância de Förster.

Durante a PCR, se o alvo de interesse estiver presente, os primers direto e reverso hibridizam e flanqueiam especificamente a sonda. A atividade exonuclease 5'→3' da polimerase de ADN faz a clivagem da sonda entre o corante repórter e o supressor apenas se os três oligonucleótidos se hibridizarem no alvo. Os fragmentos da sonda são, depois, deslocados do alvo e a polimerização da cadeia continua. A extremidade 3' da sonda é bloqueada para prevenir a extensão da sonda durante a PCR (Figura 1). Este processo ocorre em cada ciclo e não interfere com a acumulação exponencial de produto.

O aumento do sinal de fluorescência é detetado apenas se a sequência alvo for complementar aos primers e à sonda e, por conseguinte, amplificada durante a PCR. Devido a estes requisitos, a amplificação não específica não é detetada. Assim, o aumento da fluorescência é diretamente proporcional à amplificação do alvo durante a PCR.

Na qPCR, o número de ciclos de PCR necessários para detetar um sinal acima do limiar é designado ponto de passagem (Crossing point, Cp) ou limiar de ciclo (Cycle Threshold, CT) e é diretamente proporcional à quantidade de alvo presente no início da reação.

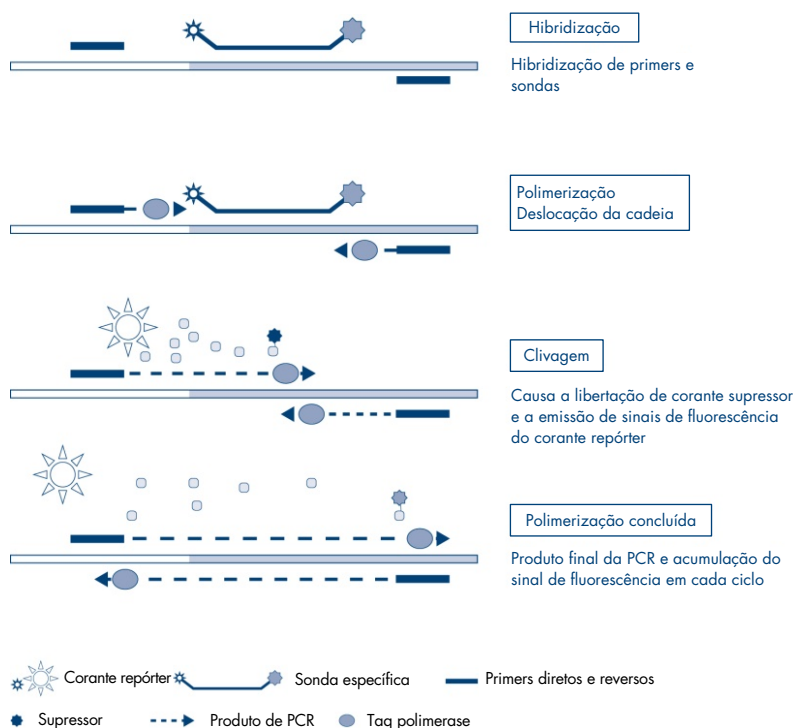
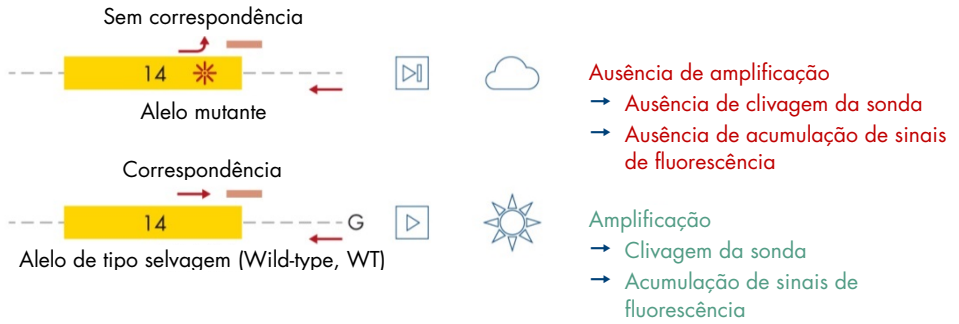


Figura 1. Princípio da reação. A tecnologia de PCR quantitativa específica de alelo usada neste kit de ensaio permite uma deteção sensível, exata e altamente reproduzível de PNU. Esta técnica baseia-se na utilização de primers reversos específicos para os alelos de tipo selvagem e V617F, respetivamente.(15) Somente uma correspondência perfeita entre o primer e o ADN alvo permite a extensão e a amplificação na reação de PCR (Figura 2).

Mistura de reação de tipo selvagem



Mistura de reação de mutante

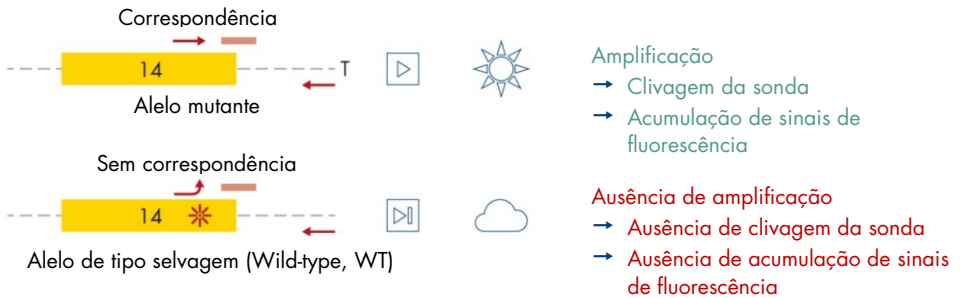


Figura 2. PCR específica de alelo. A utilização da mistura de sondas e primers de V617F ou do tipo selvagem permite a detecção específica do alelo de tipo selvagem ou mutante em duas reações separadas efetuadas com a mesma amostra. Os resultados podem ser expressos como uma percentagem das cópias mutantes entre o total de cópias de JAK2. MT: mutante; WT: tipo selvagem.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit

24

N.º de catálogo

674623

Cor	Identificação	ID do tubo	Volume
Vermelho	JAK2 Mutant Control (Controlo de mutante de JAK2) (100% alelo V617F)	MT Ctrl	33 µl
Verde	JAK2 WT Control (Controlo de tipo selvagem de JAK2) (100% alelo de tipo selvagem)	WT Ctrl	33 µl
Vermelho	JAK2 MT Quant Standard 1 (Padrão quant. 1 de mutante de JAK2) (5 x 10 ¹ cópias de V617F/5 µl)	MT QS1	20 µl
Vermelho	JAK2 MT Quant Standard 2 (Padrão quant. 2 de mutante de JAK2) (5 x 10 ² cópias de V617F/5 µl)	MT QS2	20 µl
Vermelho	JAK2 MT Quant Standard 3 (Padrão quant. 3 de mutante de JAK2) (5 x 10 ³ cópias de V617F/5 µl)	MT QS3	20 µl
Vermelho	JAK2 MT Quant Standard 4 (Padrão quant. 4 de mutante de JAK2) (5 x 10 ⁴ cópias de V617F/5 µl)	MT QS4	20 µl
Verde	JAK2 WT Quant Standard 1 (Padrão quant. 1 de tipo selvagem de JAK2) (5 x 10 ¹ cópias de tipo selvagem/5 µl)	WT QS1	20 µl
Verde	JAK2 WT Quant Standard 2 (Padrão quant. 2 de tipo selvagem de JAK2) (5 x 10 ² cópias de tipo selvagem/5 µl)	WT QS2	20 µl
Verde	JAK2 WT Quant Standard 3 (Padrão quant. 3 de tipo selvagem de JAK2) (5 x 10 ³ cópias de tipo selvagem/5 µl)	WT QS3	20 µl

Conteúdo do kit (cont.)

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit

24

N.º de catálogo

674623

Cor	Identificação	ID do tubo	Volume
Verde	JAK2 WT Quant Standard 4 (Padrão quant. 4 de tipo selvagem de JAK2) (5×10^4 cópias de tipo selvagem/5 µl)	WT QS4	20 µl
Vermelho	JAK2 MT Reaction Mix (Mistura de reação de mutante de JAK2)	MT Mix	1010 µl
Verde	JAK2 WT Reaction Mix (Mistura de reação de tipo selvagem de JAK2)	WT Mix	1010 µl
Verde-menta	Taq DNA polymerase (Polimerase Taq de ADN) (HotStarTaq® 5 unidades/µl)	Taq	85 µl
Branco	TE buffer for sample dilution (Tampão TE para diluição de amostras)	TE	1,9 ml
Branco	Water for no template control (NTC) (Água para controlo sem modelo [No Template Control, NTC])	NTC	1,9 ml
Manual do ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit (em inglês)			1

Componentes do kit

Os componentes principais do kit estão explicados a seguir.

Tabela 2. Reagentes fornecidos

Reagente	Ingredientes ativos	Volume
JAK2 Mutant Control (Controlo de mutante de JAK2)	ADN de linha celular com 100% de alelo V617F	33 µl
JAK2 WT Control (Controlo de tipo selvagem de JAK2)	ADN de linha celular com 100% de alelo do tipo selvagem	33 µl
JAK2 MT Quant Standards (Padrões de quantificação de mutante de JAK2) (QS1 a QS4)	Plasmídeos com a sequência do alelo V617F	20 µl cada
JAK2 WT Quant Standards (Padrões de quantificação de tipo selvagem de JAK2) (QS1 a QS4)	Plasmídeos com a sequência do alelo de tipo selvagem (Wild-type, WT)	20 µl cada
JAK2 MT Reaction Mix (Mistura de reação de mutante de JAK2)	Oligonucleotídeos para a deteção do alelo mutante (Mutant, MT) e do controlo interno, tampão de PCR, MgCl ₂ , dNTP	1010 µl
JAK2 WT Reaction Mix (Mistura de reação de tipo selvagem de JAK2)	Oligonucleotídeos para a deteção do alelo de tipo selvagem (Wild-type, WT) e do controlo interno, tampão de PCR, MgCl ₂ , dNTP	1010 µl
Taq DNA polymerase (Polimerase Taq de ADN)	Hot-Start Taq DNA Polymerase em tampão de armazenamento	85 µl
TE buffer for sample dilution (Tampão TE para diluição de amostras)	Solução de tampão tris-EDTA	1,9 ml
Water for no template control (Água para controlo sem modelo) (No Template Control, NTC)	Água isenta de nuclease	1,9 ml

Reagentes

Os reagentes fornecidos neste kit, listados na Tabela 2 acima, são os necessários para diluir amostras de teste ao nível necessário e para realizar as reações de qPCR para a deteção e quantificação dos alelos mutante e de tipo selvagem de *JAK2*, de modo a determinar a percentagem de mutação. O controlo de amplificação interno incluído nas misturas de reação é utilizado para monitorizar a inibição da qPCR e para excluir a falha da reação de PCR em caso de resultados negativos.

Controlos e padrões

O kit inclui dois controlos: um JAK2 Mutant Control, utilizado como um controlo positivo para a mistura de reação de mutante (Mutant, MT) de JAK2, e um JAK2 wild-type (Wild-type, WT) Control utilizado como um controlo positivo para a mistura de reação de tipo selvagem (Wild-type, WT) de JAK2. Inclui-se água isenta de nuclease para realizar um controlo sem modelo para ambas as misturas de reação.

O kit inclui quatro padrões de quantificação (Quantitation Standards, QS) de mutante de JAK2 (Mutant, MT) e quatro de tipo selvagem (Wild-type, WT) de JAK2. Estes são utilizados para calcular os números de cópias de mutante (Mutant, MT) e de tipo selvagem (wild-type, WT) de JAK2 e, por conseguinte, a percentagem de mutação *JAK2 V617F* nas amostras de teste.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Consumíveis e reagentes para extração manual de ADN

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de cat. 61104)
- Etanol (96–100%)
- **Nota:** Não utilize álcool desnaturado, pois este contém outras substâncias como metanol ou butanona.

Consumíveis e reagentes para extração automatizada de ADN

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

Consumíveis e reagentes para PCR

- Pontas de pipeta de PCR, estéreis, sem nuclease e resistentes a aerossóis com filtros hidrofóbicos
- Tubos de PCR de 1,5 ml ou 2,0 ml isentos de nuclease
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml para Rotor-Gene Q (n.º de cat. 981103 ou 981106)
- Gelo

Equipamento

- Pipetas ajustáveis* dedicadas para PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Luvas descartáveis
- Agitador de vórtex
- Bloco de aquecimento para lise de amostras a 56 °C
- Centrífuga de bancada* com rotor de tubos de reação de 0,5/1,5/2,0 ml (capaz de atingir 13 000–14 000 rpm)
- Espectrofotômetro*

Equipamento para preparação da amostra

- Instrumento QIAasymphony SP* (n.º de cat. 9001297), versão de software 4.0 ou posterior, acessórios fornecidos e protocolo Blood_200_V7_DSP (ou versão posterior)
- Tube Insert 3B (transportador de amostra (samplecarr.) de 2,0 ml v2, com inserto) (24), Qsym, n.º de cat. 9242083)

Equipamento para PCR em tempo real

- Instrumento de PCR em tempo real*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (n.º de cat. 9002032) ou Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (n.º de cat. 9002033) e acessórios fornecidos
- Rotor-Gene AssayManager®, versão de software 2.1.x (x≥0) instalado
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in, versão 1.0.x (x≥0) instalado
- Perfil de ensaio ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR (AP_ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR_V2_0_x.iap (x≥1)) importado

* Antes de utilizar, certifique-se de que os instrumentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.


Avisos e precauções

Tenha em atenção que poderá ser necessário consultar os regulamentos locais para comunicar incidentes graves, que possam ocorrer em relação ao dispositivo, ao fabricante e/ou ao representante autorizado e à autoridade reguladora do local onde o utilizador e/ou paciente se encontram.

Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet, SDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF prático e compacto em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a ficha de dados de segurança (Safety Data Sheet, SDS) de cada kit QIAGEN e respetivos componentes.

- Os espécimes e as amostras são potencialmente infecciosos. Elimine os resíduos de amostras e dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.

<p>CUIDADO</p> 	<p>NÃO adicione lixívia nem soluções ácidas diretamente aos resíduos de amostras ou de preparação.</p>
---	--

Informações para casos de emergência

CHEMTREC

Fora dos USA e do Canadá +1 703-527-3887

Precauções

A utilização de testes de qPCR exige boas práticas laboratoriais, incluindo manutenção do equipamento, que sejam específicas de biologia molecular e que estejam em conformidade com os regulamentos aplicáveis e as normas relevantes.

Este kit destina-se a ser utilizado em diagnóstico *in vitro*. Os reagentes e as instruções fornecidos neste kit foram validados para um desempenho ideal.

- O teste destina-se a ser utilizado com amostras de sangue total anticoaguladas com EDTA de potássio (EDTA K₂-) e armazenadas a uma temperatura de 2–8 °C e durante um período máximo de 96 horas até à extração de ADN.
- Todos os produtos químicos e materiais biológicos são potencialmente perigosos. Os espécimes e as amostras são potencialmente infecciosos e devem ser tratados como materiais de risco biológico.
- Elimine os resíduos de amostras e dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.
- Os reagentes do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit estão diluídos a uma concentração ideal. Não dilua mais os reagentes, pois pode comprometer o respetivo desempenho.
- Não utilize volumes de reação (mistura de reação mais amostra) inferiores a 25 µl.
- Todos os reagentes fornecidos no *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit devem ser utilizados apenas com os outros reagentes fornecidos no mesmo kit. Não substitua um reagente de um kit pelo mesmo reagente de outro *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, mesmo que pertença ao mesmo lote, pois isso pode comprometer o desempenho.
- Consulte o manual do utilizador do instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, o manual do utilizador do Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application, o manual do utilizador do Gamma Plug-In e o manual do utilizador do instrumento QIA Symphony SP para obter mais informações sobre avisos, precauções e procedimentos.
- A alteração dos tempos e das temperaturas de incubação pode dar origem a dados erróneos ou discordantes.

- Não utilize componentes fora do prazo de validade ou armazenados de forma incorreta.
- As misturas de reação podem sofrer alterações se forem expostas à luz.
- Tenha o máximo de cuidado para evitar a contaminação das misturas pelos materiais sintéticos contidos nos reagentes de padrões quantitativos de mutante (Mutant, MT) de JAK2 e de tipo selvagem (Wild-type, WT) de JAK2 e pelos reagentes de controlo de mutante (Mutant, MT) de JAK2 e de tipo selvagem (Wild-type, WT) de JAK2.
- Tenha o máximo de cuidado para evitar a contaminação por transferência dos produtos de ADN ou PCR, o que pode resultar num sinal falso-positivo.
- Tenha o máximo de cuidado para evitar a contaminação por DNase, o que pode causar a degradação do modelo de ADN.
- Utilize pipetas individuais, de uso exclusivo, para preparar misturas de reação e adicionar modelos.
- Não abra o instrumento Rotor-Gene Q MDx até que a execução esteja concluída.
- Não abra os tubos do Rotor-Gene Q depois de a execução estar concluída.
- É necessário ter cuidado para garantir testes de amostras corretos, em especial com a introdução de amostras erradas, erros de carregamento e erros de pipetagem.
- Certifique-se de que as amostras são manuseadas de uma forma sistemática para assegurar uma identificação correta a todos os momentos e manter a rastreabilidade.
- Por conseguinte, recomendamos o seguinte:
 - Utilizar material de laboratório (por ex., pipetas, pontas de pipeta, recipientes para reação) isento de nuclease e usar luvas durante a realização do ensaio.
 - Utilizar pontas de pipeta novas e resistentes a aerossóis em todas as fases de pipetagem, para evitar contaminação cruzada das amostras e dos reagentes.
 - Preparar a mistura principal pré-PCR com material dedicado (pipetas, pontas, etc.) numa área dedicada onde não sejam introduzidas matrizes de ADN (produtos de PCR, plasmídeo ou ADN). Adicionar o modelo numa zona separada (preferencialmente numa sala em separado) com material específico (pipetas, pontas, etc.).

Para obter informações de segurança relativamente aos kits de extração QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de cat 61104) e QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de cat. 937236), consulte os manuais correspondentes.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Devem ser observados os prazos de validade e as condições de armazenamento impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilize componentes fora do prazo de validade ou armazenados de forma incorreta.

Condições de expedição

O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit é expedido em gelo seco. Se qualquer componente do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (exceto a enzima) não chegar ao destino em estado congelado, se a embalagem exterior tiver sido aberta durante o transporte ou se a remessa não contiver uma nota de embalagem, o manual de instruções ou os reagentes, contacte um dos departamentos de Serviços de Assistência da QIAGEN ou os distribuidores locais (consulte a contracapa do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Condições de armazenamento

O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit deve ser armazenado, logo após ter sido recebido, a uma temperatura entre -30 e -15 °C num congelador de temperatura constante e protegido da luz.

Para obter informações relativas ao armazenamento dos kits de extração QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de cat. 61104) e QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de cat. 937236), consulte os manuais correspondentes.

Estabilidade na utilização

Quando armazenado nas condições de armazenamento especificadas, o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit permanece estável até à data de validade indicada no rótulo da caixa.

Uma vez abertos, os reagentes podem ser armazenados nas respetivas embalagens originais entre -30 °C e -15 °C durante 12 meses. O descongelamento e o congelamento repetidos devem ser evitados. Não exceda um máximo de cinco ciclos de congelação/descongelação.

Para obter informações relativas à estabilidade dos kits de extração QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de cat. 61104) e QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de cat. 937236), consulte os manuais correspondentes.

- Misture com cuidado, invertendo o tubo 10 vezes, e centrifugue todos os tubos exceto o da enzima antes da abertura.
- As datas de validade de cada reagente estão indicadas nos rótulos de cada componente. O produto manterá o seu desempenho durante o prazo de estabilidade indicado no rótulo do tubo e da caixa desde que seja mantido nas condições de armazenamento corretas.
- **Nota:** Os tubos de lotes diferentes não devem ser misturados. Todos os componentes do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit utilizados para um teste devem ser do mesmo lote. A QIAGEN implementa procedimentos de controlo de qualidade que utilizam testes funcionais para lançamento de kits em cada lote de kits individuais. Por isso, não misture reagentes de kits diferentes, mesmo que pertençam ao mesmo lote.

Armazenamento e manuseamento de amostras

Amostras de sangue total

O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit destina-se a ser utilizado com amostras de ADN genómico extraído de amostras de sangue total anticoaguladas com EDTA de potássio (EDTA K₂) armazenadas de um dos seguintes modos:

- A uma temperatura entre 2 °C e 8 °C durante um máximo de 96 horas
- A uma temperatura entre 15 °C e 25 °C durante um máximo de 96 horas
- Congeladas a uma temperatura entre -30 e -15 °C durante um máximo de 1 mês

Nota: Devem ser evitadas mudanças de temperatura entre o armazenamento no local da colheita e a expedição. As condições de armazenamento no local de teste devem ser as mesmas da expedição ou mais frias.

Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente infeccioso. Elimine os resíduos de amostras e dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.

Amostras de ADN genómico

Uma vez extraído o ADN genómico, as amostras de ADN podem ser armazenadas e expedidas a uma temperatura entre -30 °C e -15 °C durante um máximo de 24 meses. Devem ser evitados ciclos de congelamento/descongelamento. Não exceda um máximo de quatro ciclos de congelação/descongelação.

Protocolo: extração e preparação de ADN genómico a partir de sangue total


Pontos importantes antes de começar

- O ADN genómico deve ser extraído mediante a utilização do QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de cat. 61104) ou do instrumento QIAsymphony SP, juntamente com QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de cat. 937236).
- Certifique-se de que os reagentes a serem utilizados não expiraram e foram transportados e armazenados nas condições adequadas.
- **Nota:** O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit apenas foi validado em combinação com QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de cat.º 61104) ou o QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de cat. 937236). Não utilize qualquer outro produto de extração de ADN.

Extração manual de ADN genómico utilizando o QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

A extração manual de ADN genómico deve ser efetuada com o QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de cat. 61104), de acordo com o *Manual do QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit* correspondente.

Manuseamento de reagentes

- Ao preparar os tampões de lavagem para este protocolo, misturar sempre o tampão de lavagem reconstituído invertendo o frasco várias vezes antes de iniciar o procedimento.
- Utilizar pontas de pipeta com proteção contra aerossóis ao pipetar tampão de eluição do frasco e repor a tampa imediatamente para evitar contaminação.
- Ao manusear líquidos viscosos, utilizar cuidadosamente uma pipeta adequada para assegurar que são pipetados os volumes corretos.
- Evitar tocar com a ponta de pipeta na membrana da coluna de rotação QIAamp Mini.
-  Não adicionar QIAGEN Protease (QP) diretamente ao tampão de lise (AL).

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- Colocar as amostras de sangue à temperatura ambiente (15–25 °C) e garantir que estão bem homogeneizadas.
- Preparar o tampão de lise
Caso se tenha formado precipitado no tampão de lise (AL), dissolvê-lo incubando a 56 °C.
- Preparar QIAGEN Protease
Adicionar 1,2 ml de Protease Solvent (PS) ao recipiente de QIAGEN Protease (QP) liofilizada e misturar cuidadosamente. Para evitar a formação de espuma, misturar invertendo o tubo várias vezes. Garantir que a QIAGEN Protease (QP) está completamente dissolvida.
Nota: Não adicionar QIAGEN Protease (QP) diretamente ao tampão de lise (AL).
- Preparar tampão de lavagem 1
Utilizando um cilindro graduado, adicionar 25 ml de etanol (96–100%) ao frasco com 19 ml de concentrado de tampão de lavagem 1 (AW1). Armazenar o tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído à temperatura ambiente (15–25 °C).
Nota: Misturar sempre o tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído invertendo o frasco várias vezes antes de iniciar o procedimento.
- Preparar tampão de lavagem 2
Utilizando um cilindro graduado, adicionar 30 ml de etanol (96–100%) ao frasco com 13 ml de concentrado de tampão de lavagem 2 (AW2). Armazenar o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído à temperatura ambiente (15–25 °C).
Nota: Misturar sempre o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído invertendo o frasco várias vezes antes de iniciar o procedimento.
- Preparar o tampão de eluição
O kit inclui um frasco de tampão de eluição (AE). Para evitar a contaminação do tampão de eluição (AE), recomenda-se utilizar pontas de pipeta com proteção contra aerossóis ao pipetar tampão de eluição (AE) do frasco e repor imediatamente a respetiva tampa após a utilização.
- Colocar o tampão de eluição (AE) à temperatura ambiente (15–25 °C).
- Colocar um bloco de aquecimento a 56 °C para utilizá-lo posteriormente no passo 4 da secção Procedimento.

Procedimento

1. Pipetar 20 µl de QIAGEN Protease (QP) para um tubo de lise (Lysis Tube, LT).

Nota: Verificar a data de validade da protease reconstituída antes da respetiva utilização.

2. Adicionar 200 µl de amostra de sangue ao tubo de lise (Lysis Tube, LT).
3. Adicionar 200 µl de tampão de lise (AL) ao tubo de lise (Lysis Tube, LT), fechar a tampa e misturar por agitação em vórtex pulsado durante 15 segundos.

Nota: Para assegurar a lise, é fundamental que a amostra e o tampão de lise (AL) sejam muito bem misturados para obter uma solução homogénea.

Nota: Visto que o tampão de lise (AL) tem uma elevada viscosidade, garantir a adição do volume correto de tampão de lise (AL) pipetando com cuidado e utilizando uma pipeta adequada.



Não adicionar QIAGEN Protease (QP) diretamente ao tampão de lise (AL).


4. Incubar a uma temperatura de 56 °C (± 1 °C) durante 10 minutos (± 1 minuto).
5. Centrifugar o tubo de lise (Lysis Tube, LT) durante cerca de 5 segundos à velocidade máxima para remover gotas do interior da tampa.
6. Adicionar 200 µl de etanol (96–100%) ao tubo de lise (Lysis Tube, LT), fechar a tampa e misturar bem por agitação em vórtex pulsado durante ≥ 15 segundos.
7. Centrifugar o tubo de lise (Lysis Tube, LT) durante ≥ 5 segundos à velocidade máxima para remover quaisquer gotas do interior da tampa.
8. Aplicar cuidadosamente todo o lisado obtido no passo 7 à coluna de rotação QIAamp Mini sem molhar as bordas. Evitar tocar com a ponta de pipeta na membrana da coluna de rotação QIAamp Mini.
Nota: Ao processar várias amostras, abrir apenas um tubo de lise (Lysis Tube, LT) de cada vez.
9. Fechar a tampa da coluna de rotação QIAamp Mini e centrifugar a aproximadamente 6000 x g durante 1 minuto. Colocar a coluna de rotação QIAamp Mini num tubo de lavagem (Wash Tube, WT) limpo e descartar o tubo que contém o filtrado.

Nota: Se o lisado não tiver passado completamente através da membrana depois da centrifugação a aproximadamente 6000 x g (8000 rpm), centrifugar novamente à velocidade máxima (até 20 800 x g) durante 1 minuto.

Nota: Se ainda assim o lisado não passar através da membrana durante a centrifugação, eliminar a amostra e repetir o isolamento e a purificação com novo material de amostra.

10. Abrir cuidadosamente a coluna de rotação QIAamp Mini e adicionar 500 µl de tampão de lavagem 1 (AW1) sem molhar as bordas. Evitar tocar com a ponta de pipeta na membrana da coluna de rotação QIAamp Mini.
11. Fechar a tampa da coluna de rotação QIAamp Mini e centrifugar a aproximadamente 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Colocar a coluna de rotação QIAamp Mini num tubo de lavagem (Wash Tube, WT) limpo e descartar o tubo que contém o filtrado.
12. Abrir cuidadosamente a coluna de rotação QIAamp Mini e adicionar 500 µl de tampão de lavagem (AW2) sem molhar as bordas. Evitar tocar com a ponta de pipeta na membrana da coluna de rotação QIAamp Mini.
13. Fechar a tampa da coluna de rotação QIAamp Mini e centrifugar à velocidade máxima (aproximadamente 20 000 x g ou 14 000 rpm) durante 1 minuto. Colocar a coluna de rotação QIAamp Mini num tubo de lavagem (Wash Tube, WT) limpo e descartar o tubo que contém o filtrado.
14. Centrifugar à velocidade máxima (aproximadamente 20 000 x g ou 14 000 rpm) durante 3 minutos para secar completamente a membrana.
15. Colocar a coluna de rotação QIAamp Mini num tubo de eluição (Elution Tube, ET) limpo e descartar o tubo de lavagem (Wash Tube, WT) que contém o filtrado. Abrir cuidadosamente a tampa da coluna de rotação QIAamp Mini e aplicar entre 50–200 µl de tampão de eluição (AE) no centro da membrana. Fechar a tampa e incubar à temperatura ambiente (15–25 °C) durante 1 minuto. Centrifugar a aproximadamente 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto para eluir o ADN.
16. Eliminar resíduos, placas e tubos de amostras usados de acordo com os regulamentos de segurança locais.


Extração automatizada de ADN genómico utilizando o QIASymphony DSP DNA Mini Kit

A extração automatizada de ADN genómico tem de ser efetuada com o instrumento QIASymphony utilizando o módulo Sample Preparation (SP) juntamente com o QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de cat. 937236) e seguindo as instruções no *Manual do QIASymphony DSP DNA Kit*. Os elementos do protocolo específicos de uma utilização com o *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* são realizadas com o sinal  no procedimento abaixo.

Com o QIASymphony SP, o QIASymphony DSP DNA Mini Kit permite a purificação automatizada de ADN a partir de sangue total humano (utilizando o protocolo Blood_200_V7_DSP [ou versão posterior] no QIASymphony SP).

- Não é necessário pré-tratamento.
- Os tubos são transferidos diretamente para o QIASymphony SP.
- A purificação de ADN é executada com partículas magnéticas.

Pontos importantes antes de começar

-  O volume de sangue total a ser extraído é de 300 µl.

Configuração

- Assegurar que o utilizador está familiarizado com o modo de funcionamento do QIASymphony SP. Consultar os manuais de utilizador que acompanham o instrumento para obter instruções de utilização.

Manuseamento de reagentes

- Antes de utilizar um cartucho de reagentes pela primeira vez, verificar se o Buffer QSL1 e o Buffer QSB1 não contêm precipitado. Se necessário, remover as cavidades que contêm Buffer QSL1 e Buffer QSB1 do cartucho de reagentes e incubar durante 30 minutos a 37 °C, agitando de vez em quando, para dissolver o precipitado. Assegurar que as cavidades são novamente colocadas nas posições corretas. Se o cartucho de reagentes já estiver perfurado, assegurar que as cavidades são vedadas com tiras vedantes reutilizáveis e incubar o cartucho de reagente completo em banho-maria durante 30 minutos a 37 °C, agitando de vez em quando.
- Faça por não agitar excessivamente o cartucho de reagentes (Reagent Cartridge, RC), caso contrário poderá formar-se espuma que pode levar a problemas de deteção do nível líquido.

Manutenção

- A manutenção opcional para o QIAAsymphony SP não é obrigatória, mas é altamente recomendada para reduzir o risco de contaminação.

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- Antes de iniciar o procedimento, assegurar que as partículas magnéticas estão completamente ressuspendidas. Agitar vigorosamente em vórtex a cavidade que contém as partículas magnéticas durante, pelo menos, 3 minutos antes da primeira utilização.
- Assegurar que a tampa perfurável está colocada no cartucho de reagentes e que a tampa da cavidade de partículas magnéticas foi removida ou, se estiver a utilizar um cartucho de reagentes parcialmente utilizado, assegurar que as tiras vedantes reutilizáveis foram removidas.
- Assegurar que abre os tubos de enzima.
- Se as amostras tiverem códigos de barras, colocar as amostras no transportador de tubos de modo que os códigos de barras fiquem virados para o leitor de códigos de barras, no lado esquerdo do QIAAsymphony SP.

Procedimento

1. Fechar todas as gavetas e a cobertura.
2. Ligar o QIASymphony SP e aguardar até que apareça o ecrã "Sample Preparation" (Preparação da amostra) e o procedimento de inicialização esteja concluído.
Nota: O interruptor de alimentação está localizado no canto inferior esquerdo do QIASymphony SP.
3. Iniciar sessão no instrumento.
4. Assegurar que a bandeja "Waste" (Resíduos) está devidamente preparada e efetuar uma inventariação da mesma, incluindo o coletor de pontas e o recipiente de resíduos líquidos. Substituir o saco de eliminação de pontas, se necessário.
5. Colocar o suporte de eluição necessário na gaveta "Eluate" (Eluato).

Importante: Não colocar uma placa de 96 poços na "Elution slot 4" (Ranhura de eluição 4). Utilizar a "Elution slot 1" (Ranhura de eluição 1) apenas com o adaptador de arrefecimento correspondente.

Nota: Ao utilizar uma placa de 96 poços, assegurar que a placa tem a orientação correta, pois a sua colocação incorreta pode causar a mistura de amostras na análise a jusante.

6. Colocar o(s) cartucho(s) de reagente(s) e os consumíveis necessários na gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis).

Nota: Assegurar que as pontas de pipetagem estão devidamente encaixadas.

7. Efetuar uma inventariação da gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis).



8. Transferir **300 µl** da amostra de sangue total a ser extraída para um Micro tube 2.0 ml Type H isento de nuclease e colocá-lo no adaptador 3b de 2 ml no transportador de tubos de amostra. Carregar os tubos de amostras na gaveta "Sample" (Amostra).

9. Mediante a utilização do ecrã tátil, inserir as informações necessárias para cada lote de amostras a ser processado:

- **Informações da amostra:** Alterar o formato de tubos predefinido. Para o fazer, clicar em **Select All** (Selecionar tudo). Em seguida, selecionar **Sarstedt reference 72.694** (Referência Sarstedt 72.694) na tabela **Tube Insert** (Inserção para tubo).
- **Protocolo a executar:** Clicar em **Select All** (Selecionar tudo). Em seguida, na categoria, clicar em **DNA Blood** (Sangue para ADN) > **Blood_200_V7_DSP** (Blood_200_V7_DSP) (ou versão posterior) para amostra de sangue total.



- **Volume de eluição e posição de saída:** 100 µl para o protocolo de sangue total.
Nota: Após a inserção de informações sobre o lote, o estado é alterado de **LOADED** (Carregado) para **QUEUED** (Em fila de espera). Assim que um lote é colocado em fila de espera, o botão **Run** (Executar) fica ativo.

10. Iniciar o ensaio.

10a. Para iniciar o ensaio, clicar em **Run** (Executar).

10b. Ler e confirmar a mensagem que aparece.

Nota: Recomenda-se que o utilizador aguarde junto do instrumento até que este tenha executado a deteção do nível de líquido nos tubos de controlo interno e o estado do transportador do QIASymphony SP seja alterado para **RUNNING** (Em execução).

Importante: Não pausar nem interromper a execução durante o processamento (a menos que ocorra uma emergência), pois isso leva a que as amostras sejam sinalizadas como "unclear" (ambígua).

Nota: É possível carregar continuamente amostras e adicioná-las a esta execução (até que os reagentes sejam carregados).

11. Clicar em **Run** (Executar) para iniciar o procedimento de purificação.

12. No final da execução do protocolo, o estado do lote muda de **RUNNING** (Em execução) para **COMPLETED** (Concluído). Recuperar o suporte de eluição contendo os ácidos nucleicos purificados a partir da gaveta "Eluate" (Eluato).

Recomenda-se remover a placa de eluição da gaveta "Eluate" (Eluato) imediatamente após a conclusão da execução. Dependendo da temperatura e da humidade, as placas de eluição deixadas no QIASymphony SP após a conclusão do ensaio podem sofrer condensação ou evaporação.

Nota: Geralmente, as partículas magnéticas não passam para os eluatos. Se algum eluato apresentar partículas pretas, as partículas magnéticas poderão ser removidas da seguinte forma:

- 12a. Colocar o tubo que contém o ADN num separador magnético adequado (por exemplo, QIAGEN 12-Tube Magnet, n.º de cat. 36912) até que as partículas magnéticas estejam separadas.
- 12b. Se o ADN estiver em microplacas, colocar a microplaca num separador magnético adequado (por exemplo, QIAGEN 96-Well Magnet Type A, n.º de cat. 36915) até que as partículas magnéticas estejam separadas. Se não existir um separador magnético adequado, centrifugar o tubo que contém o ADN durante 1 minuto à velocidade máxima numa microcentrífuga para agregar as partículas magnéticas restantes.

13. Exportar o ficheiro de resultados do QIASymphony SP: este relatório é gerado para cada placa de eluição.

13a. Inserir o dispositivo de armazenamento de dados USB numa das portas USB, na parte da frente do QIASymphony SP.

13b. Clicar em **Tools** (Ferramentas).

13c. Selecionar **File Transfer** (Transferência de ficheiros).

13d. No separador "In-/Output Files" (Ficheiros de entrada/saída), clicar em **Results Files** (Ficheiros de resultados) > **Transfer** (Transferir).

O nome do ficheiro exportado deve ter o seguinte formato:

aaaa-mm-ddhh:mm:ss_ID do suporte de eluição

14. Verificar a coluna "Validity of result" (Validade do resultado) de cada amostra no ficheiro de resultados do QIASymphony SP.

- **Estado válido e ambíguo:** Avançar para Qualificação e quantificação de ADN.
- **Estado inválido:** A amostra é rejeitada. Reexecutar o passo de extração.

15. Se um cartucho de reagentes estiver apenas parcialmente utilizado, vedar o cartucho com as tiras vedantes reutilizáveis fornecidas e fechar os tubos que contenham proteinase K com tampas de rosca imediatamente após o final da execução do protocolo para evitar a evaporação.
16. Eliminar resíduos, placas e tubos de amostras usados de acordo com os regulamentos de segurança locais.
17. Limpar o QIASymphony SP.
Seguir as instruções de manutenção nos manuais de utilizador fornecidos com o instrumento. Assegurar que as proteções das pontas são regularmente limpas para minimizar o risco de contaminação cruzada.
18. Fechar as gavetas do instrumento e desligar o QIASymphony SP.

Qualificação e quantificação de ADN

Deve ser utilizado um branco de tampão ATE ou AE para calibrar o espectrofotómetro. É necessário utilizar estes tampões porque os tampões de eluição utilizados nos kits de extração de ADN genómico contêm azida de sódio conservante que absorve a 260 nm.

- O rácio de A_{260}/A_{280} deve ser $\geq 1,7$, pois rácios inferiores a este indicam normalmente contaminação por proteína ou a presença de químicos orgânicos e afetam o passo de PCR.
- A quantidade de ADN é determinada medindo a densidade ótica a 260 nm.
- Quantidade total de ADN purificado = concentração x volume da amostra em μl .
- Se o rácio de A_{260}/A_{280} estiver abaixo de 1,7 e/ou se a concentração de ADN genómico estiver abaixo de 10 ng/ μl , o processamento da amostra não deverá prosseguir.

Normalização de amostras de ADN genómico

O ADN deve ser diluído a 10 ng/ μ l no tampão TE incluído no *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Cada reação de PCR no Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM é otimizada para 50 ng de ADN genómico purificado diluído num volume de amostra final de 5 μ l. É necessário um total de 100 ng por amostra testada para efetuar as reações de mutante e de tipo selvagem.

Protocolo: qPCR no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Pontos importantes antes de começar

- O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit deve ser executado no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM utilizando o Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit requer especificamente o Gamma Plug-in. Este plug-in pode ser transferido a partir do site da QIAGEN: resources.qiagen.com/674623. Este plug-in deve ser instalado num computador que já tenha o Rotor-Gene AssayManager v2.1 instalado.
- O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit também requer um perfil de ensaio. Este perfil de ensaio (ficheiro **.iap**) contém todos os parâmetros necessários para efetuar a ciclagem e a análise do ensaio de qPCR. Pode ser transferido a partir da página web dedicada ao *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit no site da QIAGEN: resources.qiagen.com/674623. É necessário importar o perfil de ensaio para o software Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- É conveniente familiarizar-se durante algum tempo com o equipamento Rotor-Gene Q MDx antes de iniciar o protocolo. Para obter mais detalhes, consultar os manuais de utilizador do instrumento, do Rotor-Gene AssayManager v2.1 e do Gamma Plug-in.
- O Rotor-Gene AssayManager v2.1 permite a interpretação automatizada dos resultados da PCR. Os parâmetros de ciclagem estão bloqueados para a execução.

Configuração

- Transferir e instalar o Rotor-Gene AssayManager v2.1. Consultar "Instalar o software principal do Rotor-Gene AssayManager v2.1", na página 39, para obter informações detalhadas.
- Transferir e instalar o Gamma plug-in. Consultar "Instalar o Gamma Plug-in e importar perfil de ensaio", na página 40, para obter informações detalhadas.

- Recomendamos testar oito amostras de ADN genómico na mesma experiência para otimizar a utilização de controlos, padrões e misturas de reação. Consultar "Processamento de amostras no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM com rotor de 72 tubos", na página 43, para obter informações detalhadas.

Instalar o software principal do Rotor-Gene AssayManager v2.1

O software Rotor-Gene AssayManager v2.1 tem de estar instalado no computador ligado ao Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM e pode ser transferido a partir do site da QIAGEN: resources.qiagen.com/674623. Para obter mais detalhes sobre a instalação do software principal Rotor-Gene AssayManager v2.1, incluindo os requisitos do computador, consultar o *Manual do utilizador do Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Nota: O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit apenas pode ser executado quando determinadas definições de configuração no Rotor-Gene AssayManager v2.1 software estão programadas.

Para obter maior segurança de processos em todo o sistema, é necessário definidas as seguintes definições de configuração necessárias para o modo fechado:

- Material number required (Número do material necessário)
- Valid expiry date required (Data de validade necessária)
- Lot number required (Número de lote necessário)

Instalar o Gamma Plug-in e importar perfil de ensaio

As informações sobre a instalação e a importação do Gamma Plug-in e do perfil de ensaio estão detalhadas no *Manual do utilizador do Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* e no *Manual do utilizador do Gamma Plug-in*.

Para instalar o Gamma Plug-in

19. Transferir o Gamma Plug-in e a última versão do perfil de ensaio *ipsogen JAK2 CE IVDR* a partir do site da QIAGEN.
20. Clicar duas vezes no ficheiro **RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_x** .msi (em que $x \geq 0$). Seguir as instruções de instalação.


Para obter uma descrição detalhada deste processo, consultar a secção "Instalar plug-ins" no *Manual do Utilizador do Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Nota: Para maior segurança de processos em todo o sistema, clicar no separador "Settings" (Definições) e seleccionar o modo fechado nas caixas "**Material number required**" (Número do material necessário), "**Valid expiry date required**" (Data de validade necessária) e "**Lot number required**" (Número de lote necessário), na secção "Work list" (Lista de trabalho). Se não estiverem ativadas (seleccionadas), clicar para ativar.

21. Após a instalação bem-sucedida do plug-in, um utilizador que tenha direitos de administrador do software Rotor-Gene AssayManager v2.1 terá de importar o perfil de ensaio *ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR*.

Para importar o perfil de ensaio *ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR*



1. Clicar no ícone  do Rotor-Gene AssayManager v2.1 para abrir o software.
2. Iniciar sessão como utilizador com direitos de administrador em "Closed Mode" (Modo fechado) (Figura 3).

A janela de início de sessão é apresentada (Figura 4).

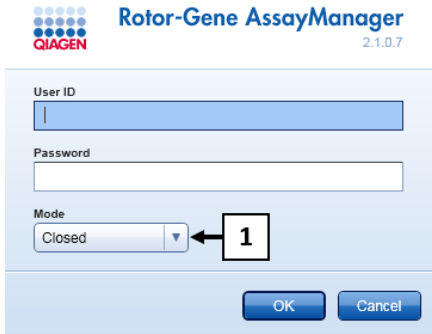


Figura 3. Janela de início de sessão no Rotor-Gene AssayManager. 1: Closed Mode (Modo fechado).

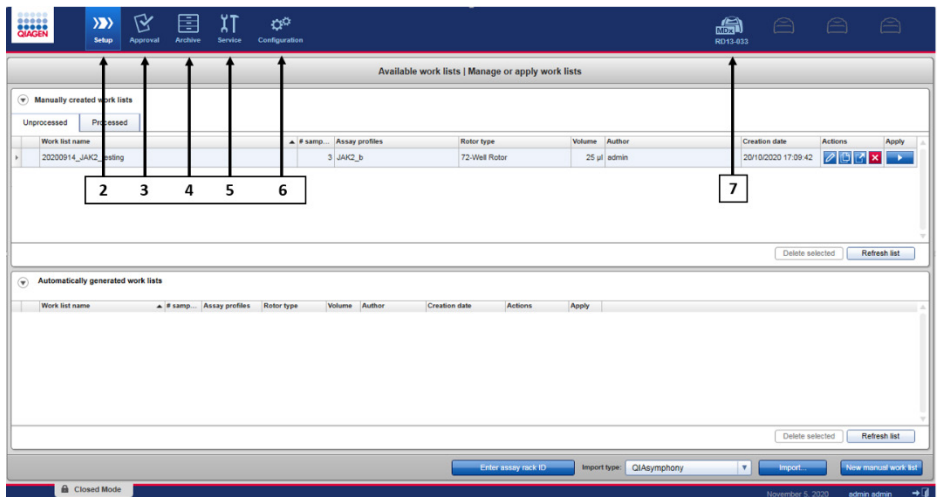


Figura 4. Rotor-Gene AssayManager v.2.1. 2: ambiente Setup (Configuração). Utilizado para criação, gestão e aplicação das listas de trabalho. 3: ambiente Approval (Aprovação). Utilizado para procurar experiências não lançadas ou parcialmente lançadas, bem como para aprovar amostras dedicadas. Os relatórios de experiência são criados após o lançamento de uma amostra. 4: ambiente Archive (Arquivo). Utilizado para procurar experiências total ou parcialmente lançadas, bem como para gerar relatórios de experiência utilizando perfis de relatório predefinidos. 5: ambiente Service (Assistência). Contém os separadores Audit Trail (Pista de auditoria) e Re-usable Data (Dados reutilizáveis). 6: Configuration (Configuração). Utilizado para ajustar as definições do Rotor-Gene AssayManager. 7: ícone do Rotor-Gene Q. Utilizado para interromper ou concluir uma execução, bem como para lançar um ciclador após concluída uma execução (e para verificar a ligação de instrumentos).

3. Clicar no ambiente Configuration (Configuração) (Figura 4, caixa 6) (Figura 5, caixa 8).
4. Clicar no separador Assay Profiles (Perfis de ensaio) (Figura 5, caixa 9).
5. Clicar em **Import** (Importar) (Figura 5, caixa 10).
6. Na caixa de diálogo Select assay profile to import (Selecionar perfil de ensaio a importar), selecionar o perfil de ensaio ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR. Clicar em **Open** (Abrir) (Figura 5, caixa 11).

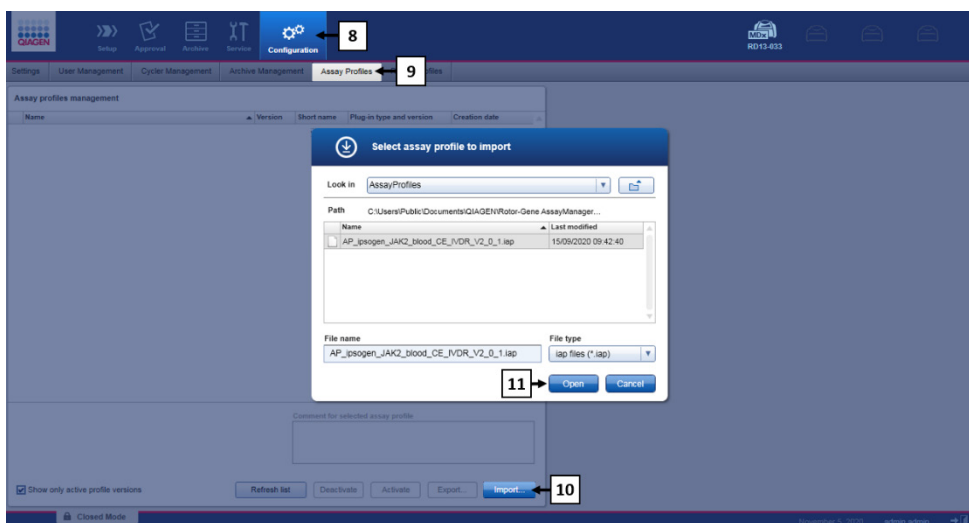


Figura 5. Importar perfil de ensaio. 8: ambiente Configuration (Configuração), 9: separador Assay profile (Perfil de ensaio), 10: botão Import (Importar), 11: botão Open (Abrir).

7. Após a importação bem-sucedida do perfil de ensaio, este pode ser utilizado no ambiente Setup (Configuração) (Figura 4, caixa 2).

Nota: Não é possível importar duas vezes a mesma versão de um perfil de ensaio.

Processamento de amostras no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM com rotor de 72 tubos

Recomendamos testar oito amostras de ADN genómico na mesma experiência para otimizar a utilização de controlos, padrões e misturas de reação.

A Tabela 3 indica o número de reações que podem ser executadas utilizando o rotor de 72 tubos.

O esquema mostrado na Figura 6 fornece um exemplo da configuração de um rotor e bloco de carregamento para uma experiência com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Os números representam as posições no bloco de carregamento e indicam a posição final no rotor.

Tabela 3. Número de reações para o instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM com rotor de 72 tubos

Amostras	Número de reações
Com JAK2 MT Reaction Mix	
8 amostras de ADN genómico	8
Padrões de quantificação de mutante de JAK2 (mutante)	4
Controlo de mutante de JAK2 (mutante)	1
Controlo de tipo selvagem de JAK2 (tipo selvagem)	1
Água para controlo sem modelo (No Template Control, NTC)	1
Com JAK2 WT Reaction Mix	
8 amostras de ADN genómico	8
Padrões de quantificação de tipo selvagem de JAK2 (tipo selvagem)	4
Controlo de mutante de JAK2 (mutante)	1
Controlo de tipo selvagem de JAK2 (tipo selvagem)	1
Água para NTC	1

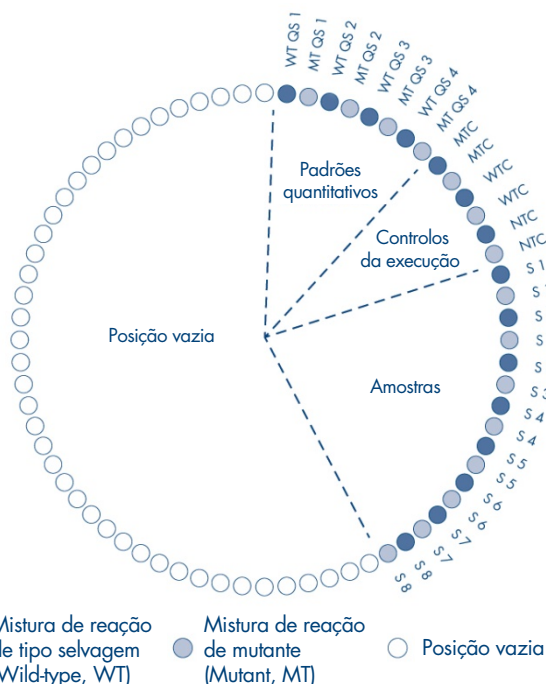
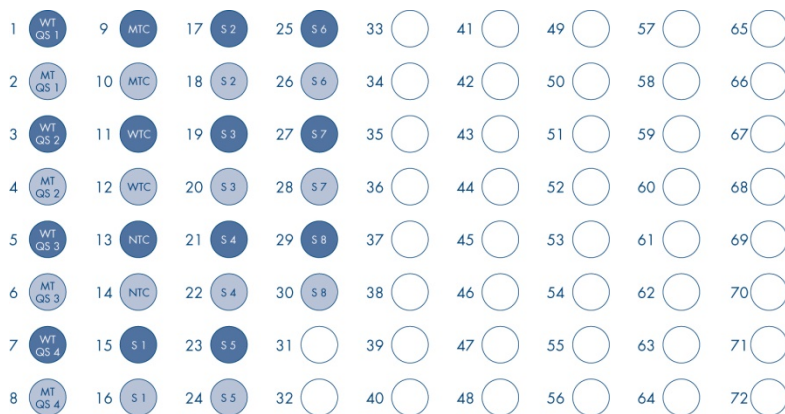


Figura 6. Configuração de rotor e placa para uma experiência com o ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit. WTC: Controle de tipo selvagem de JAK2; MTC: JAK2 mutant (MT) Control; WT-QS: Padrões de quantificação de tipo selvagem de JAK2; MT-QS: Padrões de quantificação de mutante de JAK2; S: amostra de ADN genômico; NTC: controle sem modelo (água).



Os tubos devem ser inseridos no rotor tal como indicado na Figura 6, pois a análise automatizada definida no perfil de ensaio é baseada nesta organização. Se for utilizado um esquema diferente, serão obtidos resultados anómalos.

Nota: Todas as posições não utilizadas devem ser preenchidas com tubos de tiras vazios com tampa.

qPCR no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM com rotor de 72 tubos

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento:

- Criar uma lista de trabalho para as amostras a serem processadas.

Para criar uma lista de trabalho

1. Ligar o instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
2. Abrir o software Rotor-Gene AssayManager v2.1 e iniciar sessão como um utilizador com a função de operador em "Closed Mode" (Modo fechado) (Figura 3, caixa 1).
3. É necessário assegurar que o instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM é detetado corretamente pelo software antes de iniciar a execução (Figura 7).



Figura 7. Estado de conexão do Rotor-Gene Q.

4. Clicar em "**New manual work list**" (Nova lista de trabalho manual) no ambiente "Setup" (Configuração) (Figura 8, caixa 1).

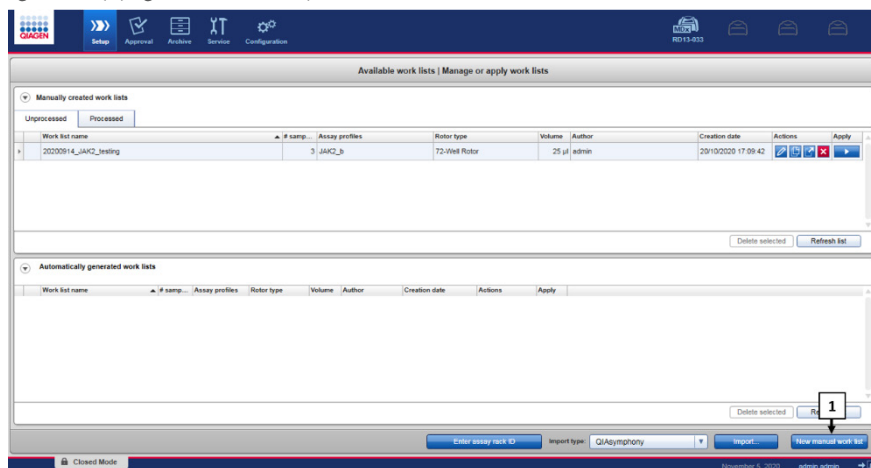


Figura 8. Criação da lista de trabalho. 1: botão de criação de nova lista de trabalho.

5. Selecionar o perfil de ensaio "**ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR**" na lista de perfis de ensaio disponíveis no passo "Assay" (Ensaio) (Figura 9, caixa 2).

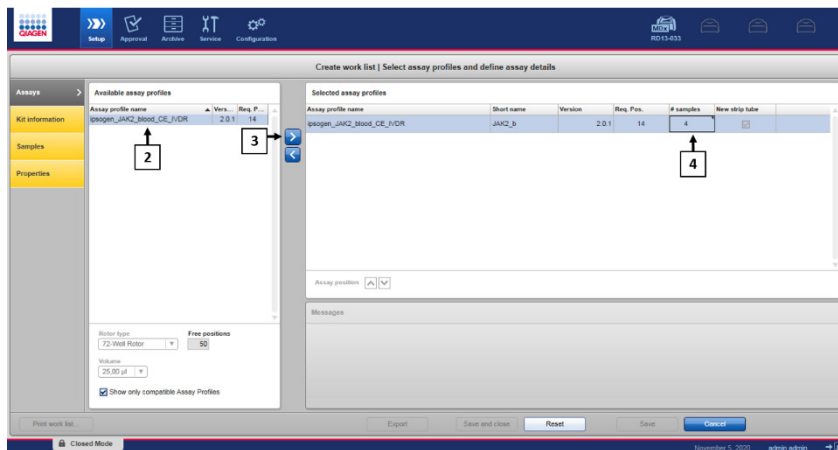


Figura 9. Criação da lista de trabalho – Seleção do perfil de ensaio. 2: perfis de ensaio disponíveis.

3: transferência do perfil de ensaio para a lista de trabalho. 4: inserir o número de amostras.

6. Clicar em ">" para transferir o perfil de ensaio selecionado para a lista "**Selected assay profiles**" (Perfis de ensaio selecionados) (Figura 9, caixa 3). O perfil de ensaio deverá ser apresentado na lista "**Selected assay profiles**" (Perfis de ensaio selecionados).
7. Inserir o número de amostras no campo correspondente (Figura 9, caixa 4).
8. Clicar no passo "Kit Information" (Informações do kit) e inserir manualmente as seguintes informações do kit de JAK2, que estão impressas na tampa da caixa:
- Material number (Número do material) 1120216 (Figura 10, caixa 6)
 - Kit expiry date (Data de validade do kit) (Figura 10, caixa 7)
 - Lot number (Número do lote) (Figura 10, caixa 8)

Nota: Como alternativa, é possível introduzir ou efetuar a leitura do código de barras do kit (Figura 10, caixa 5).

Nota: Todos os campos devem ser preenchidos. Os campos ficam azuis quando é introduzida informação válida (por exemplo, kit não expirado, material válido e números de lote introduzidos).

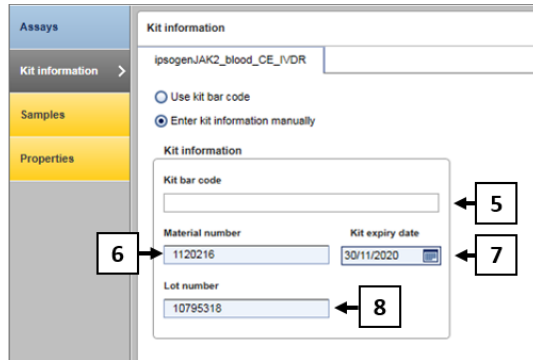


Figura 10. Criação da lista de trabalho – Inserir informações do kit. 5: Kit bar code (código de barras do kit, pode ser lido e introduzido manualmente; se o código de barras for introduzido, os outros campos são preenchidos automaticamente). 6: Material number (Número do material). 7: Kit expiry date (Data de validade do kit). 8: Lot number (Número do lote). Estas informações estão disponíveis na caixa do kit.

9. Clicar no passo "Samples" (Amostras).

É apresentada uma lista com os detalhes das amostras. A lista representa o esquema esperado do rotor.

10. Inserir os números de identificação das amostras (ID) (Figura 11, caixa 9) nesta lista, assim como quaisquer informações opcionais sobre as amostras (Figura 11, caixa 10), como um comentário para cada amostra.

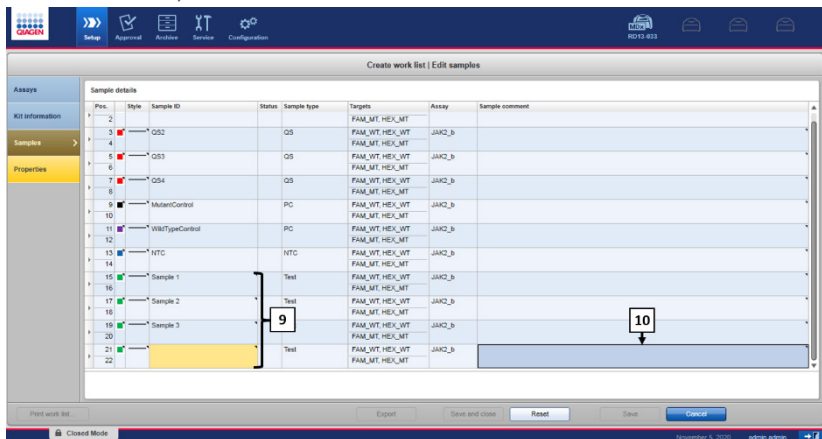


Figura 11. Criação da lista de trabalho – Introdução de informações das amostras. 9: ID da amostra. 10: comentários da amostra (opcional)

11. Clicar no passo "Properties" (Propriedades). Introduzir um nome para a lista de trabalho (Figura 12, caixa 11).
12. Marcar a caixa "**work list is complete (can be applied)**" (a lista de trabalho está concluída [pode ser aplicada]) (Figura 12, caixa 12).

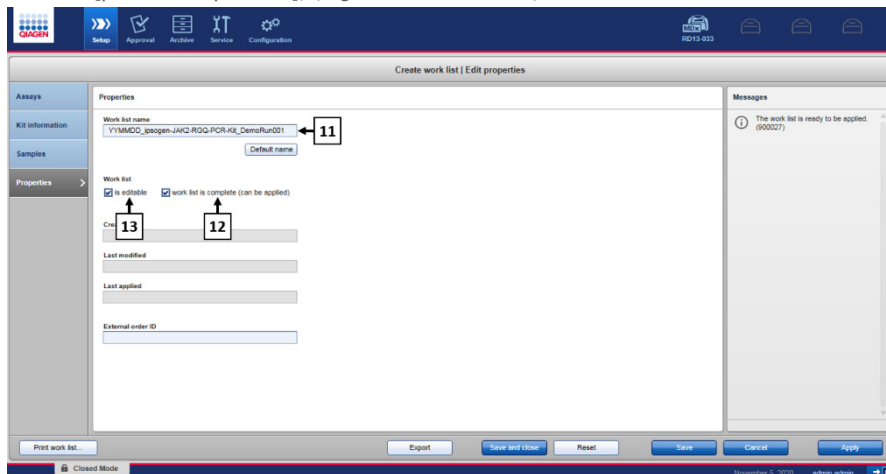


Figura 12. Criação da lista de trabalho – Propriedades. 11: Work list name (Nome da lista de trabalho). 12: marcar a opção "work list is complete" (a lista de trabalho está concluída). 13: desmarcar a caixa "is editable" (é editável) apenas se não for necessário alterar a lista de trabalho.

Nota: A caixa de verificação "**is editable**" (é editável) (Figura 12, caixa 13) define se a lista de trabalho ainda é editável ou não. Se a lista de trabalho for aplicável e não for necessário alterá-la posteriormente, desmarcar a caixa de verificação **is editable** (é editável).

13. Guardar a lista de trabalho.
14. A lista de trabalho pode ser impressa e isso poderá ajudar na preparação e configuração de qPCR. Para imprimir a lista de trabalho, clicar em "**Print work list**" (Imprimir lista de trabalho). Os detalhes das amostras são incluídos como parte desta lista de trabalho.

Nota: A lista de trabalho pode ser guardada e executada mais tarde, ou pode ser criada ao carregar a experiência no instrumento e aplicada diretamente.

Procedimento

Configurar a experiência de qPCR

1. Descongelar todos os componentes necessários, exceto a polimerase *Taq* de ADN, que deve ser mantida no congelador quando não estiver a ser utilizada. Colocar os tubos que contêm os componentes a serem descongelados no gelo.

Importante: Não exceder 30 minutos no passo de descongelamento para evitar qualquer degradação do material.

2. Limpar a área da bancada dedicada à preparação da mistura de PCR para assegurar que não há contaminação de modelos nem de nuclease.
3. Misturar cuidadosamente os tubos que contêm padrões, controlos e misturas de reação invertendo 10 vezes e centrifugando brevemente antes da utilização.
4. Preparar as seguintes misturas principais de qPCR de acordo com o número de amostras a serem processadas.

Nota: Todas as concentrações são referentes ao volume final da reação.

A Tabela 4 e a Tabela 5 descrevem o esquema de pipetagem para a preparação de misturas de um reagente para mutante (Mutant, MT) e um para tipo selvagem (Wild-type, WT), calculadas para obter volumes de reação final de 25 μ l. Estão incluídos volumes suplementares para compensar erros de pipetagem e abranger 8 amostras e controlos.

Tabela 4. Preparação de misturas principais de qPCR para deteção de sequências de JAK2 de mutante (Mutant, MT)

Componente	1 reação (μ l)	15 + 1* reações (μ l)	Concentração final
Mistura de reação de mutante de JAK2	19,8	316,8	1x
Polimerase <i>Taq</i> de ADN	0,2	3,2	1x
Amostra (a adicionar no passo 6)	5	5 cada	–
Volume total	25	25 cada	–

* Um volume de reação suplementar é incluído como volume morto.

Tabela 5. Preparação de misturas principais de qPCR para detecção de sequências de JAK2 de tipo selvagem (Wild-type, WT)

Componente	1 reação (µl)	15 + 1* reações (µl)	Concentração final
Mistura de reação de tipo selvagem de JAK2	19,8	316,8	1x
Polimerase Taq de ADN	0,2	3,2	1x
Amostra (a adicionar no passo 6)	5	5 cada	–
Volume total	25	25 cada	–

* Um volume de reação suplementar é incluído como volume morto.

Importante: Agitar em vórtex e centrifugar brevemente a mistura principal de qPCR antes de transferir 20 µl para cada tubo de tiras.

- Adicionar a água para controlo sem modelo (No Template Control, NTC) aos tubos correspondentes e fechá-los.
- Importante:** Agitar em vórtex e centrifugar brevemente o ADN (amostras de ADN genómico + QS e controlos). Depois, adicionar 5 µl do material a ser quantificado ao respetivo tubo de tiras para alcançar um volume total de 25 µl. Misturar cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.

Nota: É necessário ter o cuidado de trocar de pontas entre cada tubo, para evitar qualquer contaminação não específica de misturas de reação ou modelos e, assim, resultados falso-positivos. Começar por adicionar as amostras de teste e, em seguida, os padrões e os controlos.

- Voltar a colocar todos os componentes do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit no congelador para evitar qualquer degradação dos materiais.

Iniciar a execução

1. Preparar o Rotor-Gene Q MDx e iniciar a execução do seguinte modo.
 - 1a. Colocar um rotor de 72 poços no suporte para rotor do Rotor-Gene Q MDx.
 - 1b. Encher o rotor com tubos de tiras de acordo com as posições atribuídas, começando na posição 1, como mostrado na Figura 6 (página 44), com tubos de tiras vazios com tampa colocados em todas as posições não utilizadas.

Nota: É necessário garantir que o primeiro tubo é inserido na posição 1 e os tubos de tiras são colocados na orientação e posições corretas, como mostrado na Figura 6.
 - 1c. Fixar o anel de bloqueio.
 - 1d. Carregue o instrumento Rotor-Gene Q MDx com o rotor e o anel de bloqueio e feche a tampa do instrumento.
 - 1e. No software Rotor-Gene AssayManager v2.1, selecionar a lista de trabalho correspondente no gestor de listas de trabalho e clicar no botão **"Apply"** (Aplicar) (Figura 13, caixa 14) ou, se a lista de trabalho ainda estiver aberta, clicar no botão **"Apply"** (Aplicar).

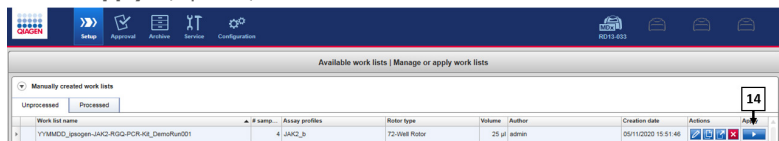


Figura 13. Configuração da execução – Seleção da lista de trabalho. 14: botão Apply (Aplicar).

Nota: Se a lista de trabalho específica da experiência não tiver sido criada, iniciar sessão no Rotor-Gene AssayManager v2.1 e seguir o processo em "Para criar uma lista de trabalho", na página 46, antes de proceder do seguinte modo.

- Inserir o nome da experiência (Figura 14, caixa 15).
- Selecionar o ciclador a ser utilizado na lista **"Cycler selection"** (Seleção do ciclador) (Figura 14, caixa 16). "
- Verificar a correta fixação do anel de bloqueio e confirmar no ecrã se o anel de bloqueio está fixado (Figura 14, caixa 17).

- Clicar em "Start run" (Iniciar execução) (Figura 14, caixa 18).

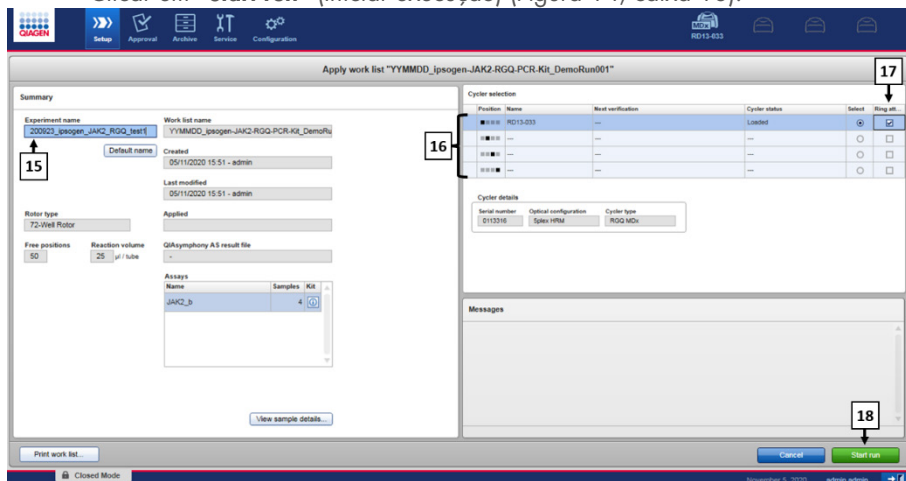


Figura 14. Configuração da execução – Definições da execução. 15: Experiment name (Nome da experiência). 16: Cycler selection (Seleção do ciclador). 17: verificar e confirmar se o anel de bloqueio está fixado. 18: botão Start run (Iniciar execução).

1f. A execução do JAK2 RGQ PCR deverá ser iniciada.

Concluir, lançar e aprovar a execução

1. Quando a execução estiver concluída, clicar em "Finish run" (Concluir execução).

Nota: Enquanto este passo não estiver concluído, a experiência não é guardada na base de dados interna.

Nota: A análise dos resultados adquiridos é realizada automaticamente, dependendo do plug-in que corresponde ao perfil de ensaio e das regras e valores de parâmetros definidos pelo perfil de ensaio.

2. Lançar e aprovar o ensaio.

- Para utilizadores com sessão iniciada com a função de aprovador, clicar em "Release and go to approval" (Lançar e avançar para aprovação).

- Para utilizadores com sessão iniciada com a função de operador, clicar em **"Release"** (Lançar).

Nota: A funcionalidade geral do ambiente "Approval" (Aprovação) é descrita no Manual do utilizador do Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in v2.1.

3. Lançar resultados.

- Se tiver sido efetuado um clique em **"Release and go to approval"** (Lançar e avançar para aprovação), os resultados da experiência são apresentados no ambiente "Approval" (Aprovação).
- Se tiver sido efetuado um clique em **"Release"** (Lançar), um utilizador com a função "Approver" (Aprovador) terá de iniciar sessão e selecionar o ambiente "Approval" (Aprovação).
- Aplicar as opções de filtragem (Figura 15, caixa 19) para selecionar a experiência a ser aprovada (Figura 15, caixa 20). Em seguida, clicar em **"Apply"** (Aplicar) (Figura 15, caixa 21).

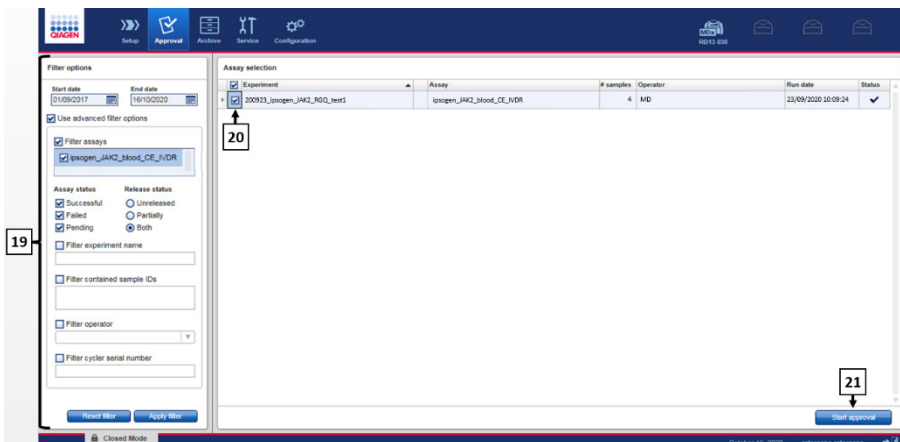


Figura 15. Aprovação da execução – Seleção da experiência. 19: Filter options (Opções de filtragem). 20: Assay selection (Seleção do ensaio). 21: botão Start approval (Iniciar aprovação).

- É apresentado o seguinte alerta AUDAS (Automatic Data Scan [Leitura automática de dados]) (Figura 16). Na secção "Plots and Information" (Gráficos e informações), verificar manualmente as curvas de fluorescência dos alvos HEX quanto a anomalias (por ex., picos causados por erros de hardware).

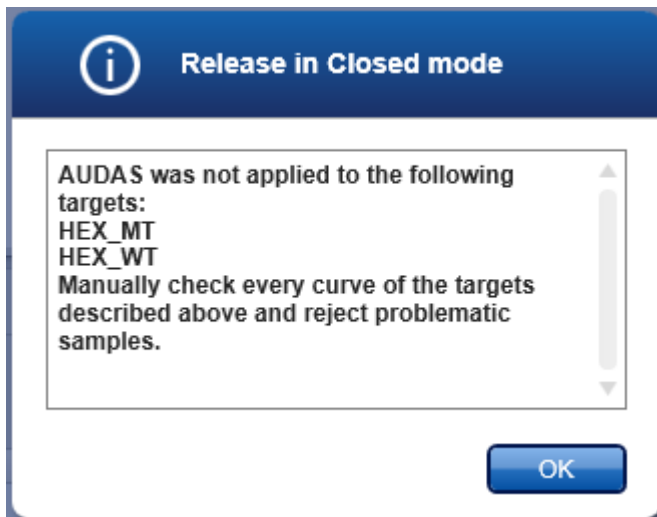


Figura 16. Alerta AUDAS.

Nota: As curvas dos alvos HEX de controlo interno não apresentam formas tipicamente sigmóides (semelhantes às curvas exemplificativas na Figura 17) e têm de ser consideradas curvas válidas. Chamamos a atenção para o facto de todos os outros critérios de validade de controlos internos (por exemplo, limite de corte de C_T) serem verificados automaticamente pelo software.

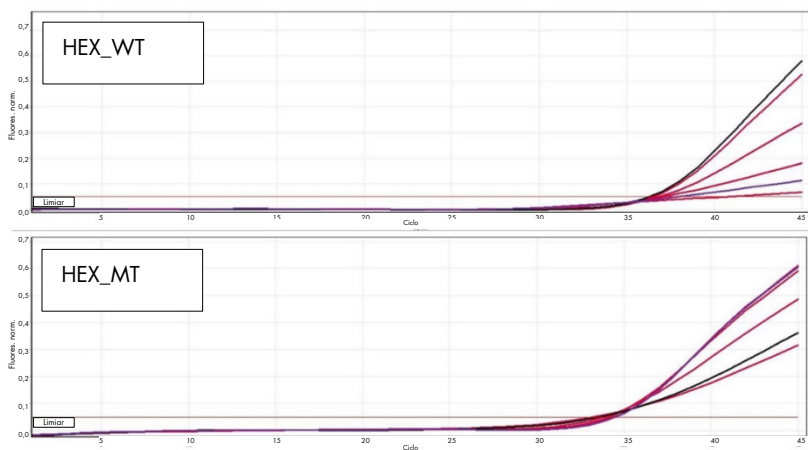


Figura 17. Curvas HEX de controlo interno.

Os resultados das amostras de teste são analisados automaticamente pelo Rotor-Gene AssayManager v2.1, mas têm de ser aprovados e lançados pelo utilizador com sessão iniciada com a função de aprovar. Inicialmente, todas as amostras de teste de uma experiência concluída apresentam o estado "Undefined" (Indefinida). Os resultados das amostras a serem aprovados têm três botões de aprovação no final da coluna correspondente. Estes botões são utilizados para aceitar ou rejeitar dinamicamente os resultados das amostras (Figura 18 e Figura 19).

Nota: Uma amostra comunicada como "INVALID" (Inválida) pelo Rotor-Gene AssayManager v2.1 não pode ser reclassificada como "VALID" (Válida), mesmo que o resultado da amostra seja rejeitado.

Nota: Uma amostra deve ser rejeitada se o utilizador não concordar com o resultado e pretender repetir o teste (por ex., se for observada uma anomalia nas curvas dos alvos HEX de controlo interno).

- Rever resultado (Figura 19, caixa 22) e clicar em "**Release/Report data**" (Lançar/comunicar dados) (Figura 19, caixa 23).

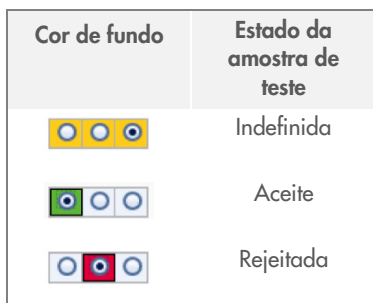


Figura 18. Definição do estado de aprovação da amostra.

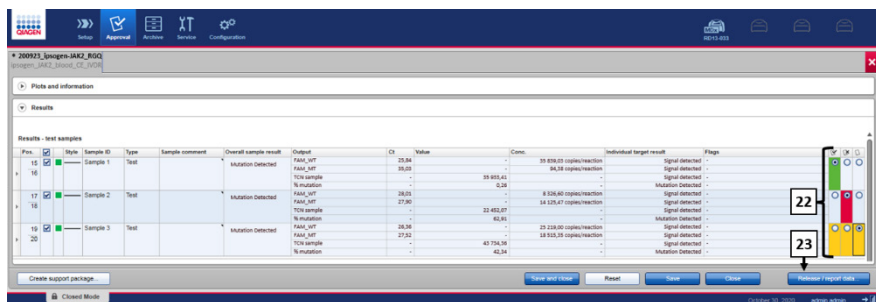


Figura 19. Lançar e comunicar dados. 22: botões de aprovação de amostras (para aprovar [✓] ou rejeitar [✗] os resultados de cada amostra). 23: botão "Release and report data" (Lançar e comunicar dados).

- Inserir a palavra-passe, se exigido, marcar a caixa **"Create report"** (Criar relatório) e clicar em **"OK"** (Figura 20, caixas 24 e 25). O relatório será gerado em formato .pdf e armazenado automaticamente na pasta predefinida. O caminho predefinido da pasta é:
C: > Users (Utilizadores) > Public (Público) > Documents (Documentos) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Exportar) > Reports (Relatórios).
Nota: Este caminho e esta pasta podem ser alterados no ambiente Configuration (Configuração).

- Simultaneamente, um ficheiro LIMS é criado automaticamente e guardado na pasta predefinida. O caminho predefinido da pasta é: **C: > Users (Utilizadores) > Public (Público) > Documents (Documentos) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Exportar) > LIMS.**

Nota: Este caminho e esta pasta podem ser alterados no ambiente Configuration (Configuração).

- Fechar o ficheiro pdf e regressar ao Rotor-Gene AssayManager. Clicar em **"OK"** quando solicitado (Figura 20, caixa 26).

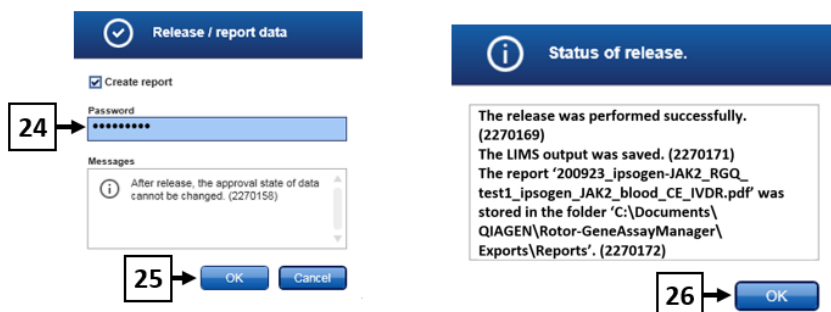


Figura 20. Lançar e comunicar dados. 24: palavra-passe do utilizador. 25–26: botão OK para selecionar.

- Após a introdução da palavra-passe do utilizador, um relatório PDF é criado e aberto. Fechar o relatório PDF. Um ficheiro LIMS é então criado automaticamente, e aparece uma declaração de lançamento. Clicar em **"OK"**. O ensaio está agora totalmente lançado. Clicar em **"OK"** para aceder ao ambiente "Archive" (Arquivo).
- Clicar no separador "Archive" (Arquivo) para exportar o ficheiro .rex correspondente aos dados não processados. Encontre as suas experiência utilizando as opções de filtragem (Figura 21, caixas 27 e 28) e clique em **"Show assays"** (Mostrar ensaios) (Figura 21, caixa 29).

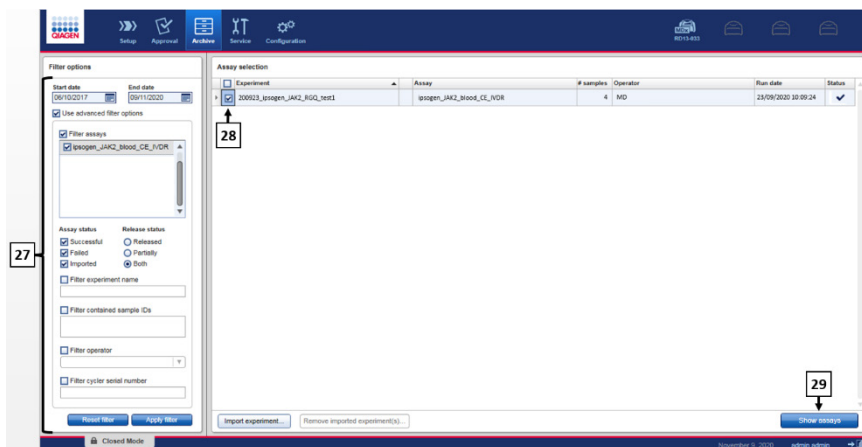


Figura 21. Ambiente Archive (Arquivo). 27: Filter options (Opções de filtragem). 28: Assay selection (Seleção do ensaio). 29: botão Show assays (Mostrar ensaios).

- Os resultados das experiências são apresentados. No canto inferior direito do ecrã, selecionar **".rex-file"** (ficheiro .rex) como o tipo de ficheiro a ser exportado. Clicar em **"Export"** (Exportar). Clicar em **"OK"** para guardar. O software guarda automaticamente o ficheiro .rex na seguinte pasta predefinida: **C: > Users (Utilizadores) > Public (Público) > Documents (Documentos) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Exportar) > Experiments (Experiências)**.
Nota: Este caminho e esta pasta podem ser alterados no separador "Specify the .rex file export destination" (Especificar o destino de exportação do ficheiro .rex).
Nota: Para efeitos de resolução de problemas, é necessário criar um pacote de assistência a partir da execução. Os pacotes de assistência podem ser gerados a partir do ambiente de arquivo ou de aprovação (*Manual do utilizador do Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*, secção "Resolução de problemas", "Criar um pacote de assistência"). Além disso, a pista de auditoria da hora do incidente ± 1 dia poderá ser útil. A pista de auditoria pode ser obtida no ambiente Service (Assistência) (*Manual do utilizador do Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*, secção 1.5.5.5).

4. Descarregar o instrumento Rotor-Gene Q MDx e eliminar os tubos de tiras de acordo com os regulamentos de segurança locais.

Interpretação de resultados

A análise é totalmente automatizada.

O Rotor-Gene AssayManager v2.1 analisa primeiro* as curvas de amplificação e pode invalidar curvas que não estejam em conformidade, dependendo da respetiva forma e amplitude de ruído. Se for esse o caso, um alarme estará associado à curva invalidada.

O Rotor-Gene AssayManager v2.1 irá analisar depois os controlos de execução:

- Controlo sem modelo (No Template Control, NTC): o controlo sem modelo (No Template Control, NTC) é verificado relativamente à ausência de amplificação específica (JAK2 de tipo selvagem [Wild-type, WT] e JAK2 de mutante [Mutant, MT]).
- Padrões de quantificação (Quantitation Standards, QS) de mutante (Mutant, MT) e de tipo selvagem (Wild-type, WT): A validação dos padrões de quantificação baseia-se nos valores de declive e R^2 de cada curva-padrão.
- Controlo de tipo selvagem (Wild-type Control, WTC): o número total de cópias (Total Copy Number, TCN) de JAK2 tem de ser suficientemente elevado para que este controlo seja interpretado. Se for esse o caso, será calculada a percentagem de mutação de JAK2. Este controlo de execução é validado se o respetivo estado for de tipo selvagem (Wild-type, WT) de acordo com o teste.
- Controlo de mutante (Mutant Control, MTC): o número total de cópias de JAK2 tem de ser suficientemente elevado para que este controlo seja interpretado. Se for esse o caso, será calculada a percentagem de mutação de JAK2. Este controlo de execução é validado se o respetivo estado for altamente positivo para a mutação de JAK2.

* Ativado apenas para alvos FAM.

O controlo interno (Internal Control, IC) tem de ser amplificado em todos os poços que contenham controlos e padrões de quantificação e tem de estar dentro do intervalo predefinido para controlos.

Nota: O relatório gerado no final de cada execução mostra os resultados obtidos em controlos de execução. Todos os dados inválidos serão associados a um alarme de invalidação (Tabela 6).

Se algum destes controlos de execução não estiver em conformidade, será utilizado o alarme "ASSAY_INVALID". Se este alarme for realçado, a execução deverá ser considerada inválida e será necessário repetir a experiência.

Se todos os controlos da execução estiverem em conformidade, o Rotor-Gene AssayManager v2.1 irá analisar as amostras de teste.

- O controlo interno (Internal Control, IC) tem de ser amplificado em todos os poços que contenham amostras e tem de estar dentro do intervalo predefinido.
- O número total de cópias deve ser suficientemente elevado numa determinada amostra para que os resultados sejam interpretados.
- A percentagem de mutação de JAK2 será depois calculada e o resultado será apresentado. É necessário observar um valor de limiar de ciclo (Cycle Threshold, CT) em cada tubo (tipo selvagem [Wild-type, WT] e mutante [Mutant, MT]) para que uma amostra seja validada pelo Rotor-Gene AssayManager v2.1 e para que o resultado correspondente seja válido.

Nota: Se os controlos de execução e os resultados das amostras forem válidos, o relatório irá mostrar o número de cópias e a percentagem de mutação para cada amostra.

- A Tabela 6 mostra os alarmes de invalidação de amostras que podem ser atribuídos a um tubo específico durante a análise efetuada pelo Rotor-Gene AssayManager v2.1, juntamente com uma explicação do significado de cada alarme.
- A Tabela 7 (página 66) apresenta os alarmes de aviso para amostras e a descrição de termos.

Tabela 6. Alarmes de invalidação de amostras e descrição de termos

Alarme	Descrição
ANALYSIS_FAILED	O ensaio é definido como inválido porque a análise falhou. Contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN.
ASSAY_INVALID	O ensaio é inválido porque pelo menos um controlo externo é inválido.
CONSECUTIVE_FAULT	O alvo utilizado para o cálculo deste alvo é inválido.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	A curva de amplificação de dados não processados mostra uma forma que se desvia do comportamento estabelecido para este ensaio. Existe uma elevada probabilidade de ocorrerem resultados erróneos ou uma interpretação errónea de resultados.
FLAT_BUMP	A curva de amplificação de dados não processados mostra a forma de uma lomba plana que se desvia do comportamento estabelecido para este ensaio. Existe uma elevada probabilidade de ocorrerem resultados erróneos ou uma interpretação errónea de resultados (por exemplo, determinação de valor C_T errónea).
INVALID_CALCULATION	O cálculo para este alvo falhou.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	O valor C_T detetado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo de mutante com a mistura de reação de tipo selvagem.
MC_IC_LOW_CT (WT)	O valor C_T detetado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo de mutante com a mistura de reação de tipo selvagem.
MC_IC_NO_CT (MT)	Nenhum C_T detetável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo de mutante com a mistura de reação de mutante.
MC_IC_NO_CT (WT)	Nenhum C_T detetável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo de mutante com a mistura de reação de tipo selvagem.
MC_LOW_CN	O número de cópias para o controlo de mutante é demasiado baixo.
MC_LOW_PERCENTAGE	A percentagem de mutações do controlo de mutante é demasiado baixa.
MC_NO_CN	Não existe número de cópias para o controlo de mutante.
MC_NO_CT (MT)	C_T não detetável para o controlo de mutante com a mistura de reação de mutante.

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 6. Alarmes de invalidação de amostras e descrição de termos (cont.)

Alarme	Descrição
MC_NO_VALUE	A percentagem de mutações do controlo de mutante não tem qualquer valor.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	O C_T detetado é inferior ao esperado para o controlo de mutante com a mistura de reação de mutante.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	O C_T detetado é inferior ao esperado para o controlo de mutante com a mistura de reação de tipo selvagem.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	A curva de amplificação ultrapassa o limiar mais do que uma vez. Um C_T não ambíguo não pode ser determinado.
NO_BASELINE	Não foi encontrada qualquer linha de base inicial. Não foi possível efetuar a análise subsequente.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	O valor C_T detetado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reação de mutante.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	O valor C_T detetado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reação de tipo selvagem.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Nenhum C_T detetável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reação de mutante.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Nenhum C_T detetável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reação de tipo selvagem.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	O valor C_T detetado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reação de mutante.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	O valor C_T detetado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reação de tipo selvagem.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	Foi detetado C_T no controlo sem modelo.
OTHER_TARGET_INVALID	Um outro alvo para a mesma amostra é inválido.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	A concentração calculada para esta amostra excede o limite técnico.

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 6. Alarmes de invalidação de amostras e descrição de termos (cont.)

Alarme	Descrição
QS_HIGH_SLOPE (MT)	O limite superior do declive de mutante é excedido.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	O limite superior do declive de tipo selvagem é excedido.
QS_IC_NO_CT (MT)	Nenhum C_T detetável para o controlo interno no mesmo tubo que um ou mais padrões de quantificação de mutante.
QS_IC_NO_CT (WT)	Nenhum C_T detetável para o controlo interno no mesmo tubo que um ou mais padrões de quantificação de tipo selvagem.
QS_LOW_SLOPE (MT)	O limite inferior do declive de mutante não é atingido.
QS_LOW_SLOPE (WT)	O limite inferior do declive de tipo selvagem não é atingido.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	O limite inferior do R^2 de mutante não é atingido.
QS_LOW_RSQUARED (WT)	O limite inferior do R^2 de tipo selvagem não é atingido.
QS_NO_CT (MT)	Nenhum C_T detetável para um ou mais padrões de quantificação de mutante.
QS_NO_CT (WT)	Nenhum C_T detetável para um ou mais padrões de quantificação de tipo selvagem.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	O C_T detetado é inferior ao esperado para um ou mais padrões de quantificação de mutante.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	O C_T detetado é inferior ao esperado para um ou mais padrões de quantificação de tipo selvagem.
RUN_FAILED	O ensaio é definido como inválido devido a um problema com o ciclador ou com a conexão do ciclador.
RUN_STOPPED	O ensaio é definido como inválido porque a execução foi interrompida manualmente.
SAMPLE_LOW_CN	O número total de cópias para uma amostra de teste é demasiado baixo.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	O valor C_T detetado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que a amostra de teste com a mistura de reação de mutante.

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 6. Alarmes de invalidação de amostras e descrição de termos (cont.)

Alarme	Descrição
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	O valor C_T detetado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que a amostra de teste com a mistura de reação de mutante.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Nenhum C_T detetável para o controlo interno no mesmo tubo que uma amostra de teste com a mistura de reação de mutante.
SAMPLE_NO_CN	Não existe número de cópias para uma amostra de teste.
SAMPLE_NO_VALUE	A percentagem de mutações de uma amostra de teste não tem qualquer valor.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	O C_T detetado é inferior ao esperado para uma amostra de teste com a mistura de reação de mutante.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	O C_T detetado é inferior ao esperado para uma amostra de teste com a mistura de reação de tipo selvagem.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	O valor C_T detetado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que a amostra de teste com a mistura de reação de tipo selvagem.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	O valor C_T detetado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que a amostra de teste com a mistura de reação de tipo selvagem.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Nenhum C_T detetável para o controlo interno no mesmo tubo que uma amostra de teste com a mistura de reação de tipo selvagem.
SATURATION	A fluorescência dos dados não processados está em forte saturação antes do ponto de inflexão da curva de amplificação.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	É detetado um pico na curva de amplificação perto de C_T .
STEEP_BASELINE	É detetada uma linha de base que sobe em flecha para a fluorescência dos dados não processados na curva de amplificação.
STRONG_BASELINE_DIP	É detetada uma forte queda na linha de base para a fluorescência dos dados não processados na curva de amplificação.
STRONG_NOISE	Ruído forte detetado fora da fase ascendente da curva de amplificação.

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 6. Alarmes de invalidação de amostras e descrição de termos (cont.)

Alarme	Descrição
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Ruído forte detetado na fase ascendente (exponencial) da curva de amplificação.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	É detetada uma linha de base ondulada para a fluorescência de dados não processados na curva de amplificação.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	A percentagem de mutações do controlo de tipo selvagem é demasiado elevada.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	O valor C_T detetado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo de tipo selvagem com a mistura de reação de mutante.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	O valor C_T detetado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo de tipo selvagem com a mistura de reação de mutante.
WTC_IC_NO_CT (MT)	Nenhum C_T detetável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo de tipo selvagem com a mistura de reação de mutante.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Nenhum C_T detetável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo de tipo selvagem com a mistura de reação de tipo selvagem.
WTC_NO_CN	Não existe número de cópias para o controlo de tipo selvagem.
WTC_NO_VALUE	A percentagem de mutações do controlo de tipo selvagem não tem qualquer valor.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	O C_T detetado é inferior ao esperado para o controlo de tipo selvagem com a mistura de reação de mutante.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	O C_T detetado é inferior ao esperado para o controlo de tipo selvagem com a mistura de reação de tipo selvagem.

Tabela 7. Alarmes de aviso para amostras e descrição de termos

Alarme	Descrição
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	A alteração da percentagem de fluorescência desta amostra relativamente ao tubo de amostra com a maior alteração de fluorescência é inferior a um limite definido.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	A eficiência da reação para esta amostra não atingiu um limite definido.
SPIKE	É detetado um pico na fluorescência de dados não processados na curva de amplificação mas fora da região onde C_T é determinado.

Limitações

O kit destina-se a ser utilizado por profissionais.

O produto deve ser utilizado apenas por profissionais com formação específica, especializados em técnicas de biologia molecular e familiarizados com a tecnologia do dispositivo. O procedimento do dispositivo destina-se a ser implementado num ambiente laboratorial de biologia molecular.

O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit não é um dispositivo automatizado; no entanto, a análise é assistida por um software dedicado para a quantificação automática de mutações.

Este kit deve ser utilizado seguindo as instruções constantes deste manual, em combinação com um equipamento validado indicado em "Materiais necessários, mas não fornecidos", na página 19.

Deve prestar-se atenção às datas de validade impressas no rótulo da caixa e nos rótulos dos tubos. Não utilizar componentes fora do prazo de validade.

Todos os reagentes fornecidos no *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit devem ser utilizados apenas com os outros reagentes fornecidos no mesmo kit. O incumprimento desta diretriz poderá afetar o desempenho.

O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit está apenas validado para sangue total humano periférico anticoagulado com EDTA 2K colhido de pacientes com NMP suspeita ou detetada.

O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit está apenas validado para utilização com o QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de cat. 937236) ou o QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de cat. 61104).

O *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit está apenas validado para utilização com o Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (para PCR) e o QIAsymphony SP (para preparação da amostra).

Qualquer outra utilização não indicada deste produto e/ou modificação dos componentes anulará qualquer responsabilidade da QIAGEN.

Todos os resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados em conjunto com outros resultados clínico-patológicos. A ausência da mutação JAK2 V617F/G1849T não exclui a presença de outras mutações de JAK2. O teste pode indicar resultados falso-negativos em caso de mutações adicionais localizadas nos nucleótidos 88504 a 88622.(16)

O utilizador é responsável por validar o desempenho do sistema quanto a quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório que não estejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Características de desempenho

Desempenho analítico

Limite de branco

O limite de branco (Limit of Blank, LoB) foi determinado mediante o seguimento da norma CLSI/NCCLS EP17-A2, em 30 amostras de sangue total de doadores saudáveis com um estado de JAK2 de tipo selvagem (Wild-type, WT), utilizando três lotes de reagentes (120 medições/lote).

Os resultados do limite de branco (Limit of Blank, LoB) estão resumidos na Tabela 8. Isto corresponde ao valor esperado numa população normal utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Tabela 8. Resumo dos resultados do limite de branco (Limit of Blank, LoB)

	Limite de branco (Limit of Blank, LoB) medido	Limite de branco final
Lote 1	0%	
Lote 2	0%	0%
Lote 3	0%	

Limite de detecção

O limite de detecção (Limit of Detection, LoD), ou sensibilidade analítica, foi determinado com base na "abordagem Probit" descrita na norma CLSI/NCCLS EP17-A2. Neste estudo, foram analisados 6 níveis baixos de mutação de 3 amostras independentes (ADN de sangue total de NMP fortificado com ADN de sangue total de tipo selvagem [Wild-type, WT]), com 3 lotes e 60 medições por amostra e por mutação. Os resultados obtidos indicaram que a sensibilidade analítica é de 0,042% para mutação JAK2 V617F.

Os resultados do limite de detecção (Limit of Detection, LoD) estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Resumo dos resultados do limite de detecção (Limit of Detection, LoD)

	Limite de detecção (Limit of Detection, LoD) medido	Limite de detecção final
Lote 1	0,041%	
Lote 2	0,029%	0,042%
Lote 3	0,042%	

Limite de quantificação

A definição e a determinação do limite de quantificação (Limit of Quantitation, LoQ) foram baseadas na diretriz CLSI/NCCLS EP17-A2. O limite de quantificação (Limit of Quantitation, LoQ) foi definido como o nível de percentagem de mutação JAK2 V617F mais baixo que pode ser distinguido com precisão a partir do limite de detecção (Limit of Detection, LoD) do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit com um intervalo de confiança de 95% (risco de erro $\alpha = 0,05$). Os dados do estudo de repetibilidade num único centro foram utilizados para calcular o limite de quantificação (Limit of Quantitation, LoQ) do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Os resultados obtidos indicam que o limite de quantificação (Limit of Quantitation, LoQ) é de 0,233% da mutação JAK2 V617F.

No contexto da monitorização de doenças moleculares, isto implica que se a percentagem da mutação JAK2 V617F medida for inferior a 0,233% num dado momento, uma redução da carga do alelo JAK2 V617F não pode ser quantificada de forma fiável no momento seguinte.

Linearidade

A linearidade da quantificação da mutação de JAK2 em pacientes com NMP foi avaliada de acordo com a norma CLSI/NCCLS EP06AE, com um lote do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit e com testes em 11 níveis de mutação para cinco entradas de ADN diferentes. A quantificação da carga de mutação de JAK2 em amostras de NMP é linear; por exemplo, o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit quantifica amostras desde o valor do limite de detecção (Limit of Detection, LoD) até 100% de mutação, o que corresponde aos valores esperados na população afetada, desde que a concentração da amostra de ADN quantificada esteja perto de 10 ng/ μ l (entre 5 e 20 ng/ μ l).

Repetibilidade e reprodutibilidade

A estrutura do estudo de precisão num único centro cumpre os requisitos da norma CLSI/NCCLS EP5-A3. Foram realizados testes em 11 níveis de mutação, de 0,07% a 72,67%, utilizando diluições em série de uma amostra clínica de um paciente com NMP. Para cada nível de mutação, foram obtidas 108 medições por três operadores durante 27 dias (duas réplicas por execução e duas execuções por dia) utilizando três lotes de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit e três instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. A precisão para o nível de 100% é expressa por comparação com a precisão determinada para o nível de 72,67%, com base em análises de tendência apoiadas por dados adicionais obtidos numa amostra de 100% de JAK2 V617F constituída por ADN da linha celular MUTZ-8 (38 medições).

Os resultados estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados de precisão: repetibilidade (estudo num único centro)

Amostra	Percentagem média de mutação de JAK2	DP _{R+}	DP _{EXECUÇÃO++}	DP _{TOTAL+++}	CV _{TOTAL}
S0	100	N/D	N/D	≤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%

DP: desvio-padrão

R+: repetibilidade

EXECUÇÃO++: precisão entre execuções

TOTAL+++: precisão total (incluindo entre instrumentos, operadores e lotes)

CV_{TOTAL}: coeficiente de variação da precisão total em percentagem

N/D: não determinado

A estrutura do estudo de precisão entre laboratórios cumpre os requisitos da norma CLSI/NCCLS EP5-A3. O estudo envolveu quatro centros (França, Alemanha e dois centros nos EUA). Os testes foram realizados em sete níveis de mutação, de 1,21% a 67,64%, utilizando diluições da linha celular MUTZ-8 em sangue total de doadores saudáveis (ou seja, amostras artificiais). Cada centro realizou três execuções de extração de ADN utilizando o instrumento QIA Symphony SP e um lote único do QIA Symphony DSP DNA Mini Kit. Cada extrato de ADN foi testado em oito execuções de qPCR (duas execuções por dia e por centro durante quatro dias não consecutivos) utilizando um lote único de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, dando origem a 96 medições esperadas por amostra de todos os centros.

A amostra L2 foi inválida numa execução de extração, dando origem a um total de 88 testes de qPCR em vez de 96. Além disso, uma execução de qPCR foi inválida, dando origem a três testes inválidos para todas as amostras (exceto L2, ou seja, 2 resultados inválidos). Adicionalmente, a amostra L7 foi inválida numa execução de qPCR e a L4 foi inválida em duas execuções de qPCR, originando dois testes inválidos adicionais (Tabela 11).

A precisão para o nível de 100% é expressa por comparação com a precisão determinada para o nível de 67,64%, com base em análises de tendência apoiadas por dados adicionais obtidos numa amostra de 100% de JAK2 V617F constituída por ADN da linha celular MUTZ-8 (38 medições).

Tabela 11. Resultados de precisão: reprodutibilidade (estudo entre laboratórios)

Amostra	Total de testes	Total de testes inválidos	Média de JAK2%MT	Intra-execuções, DP, %CV	Inter-execuções, intradiária, DP, %CV	Intradiária, DP, %CV	Intercentros, DP, %CV	Total, DP, %CV
L0	N/A	N/A	100	N/A	N/A	N/A	N/A	≤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: percentagem de mutação de JAK2; **DP: desvio-padrão;** **CV:** coeficiente de variação em percentagem; **N/A:** Não aplicável

Foi realizado um estudo entre laboratórios adicional em três centros de testes (um na Europa e dois nos EUA), em quatro amostras de sangue total de pacientes com NMP (ou seja, amostras clínicas). Cada centro realizou três execuções de extração de ADN. Cada extrato de ADN foi testado em 12 execuções de qPCR (uma réplica por execução por amostra, duas execuções por dia por operador em cada centro — estiveram envolvidos dois operadores por centro — durante três dias não consecutivos) num instrumento Rotor-Gene Q MDx utilizando um único lote de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Para cada amostra, foram obtidas 36 medições (Tabela 12).

Tabela 12. Resultados do estudo adicional entre laboratórios

Amostra	N	Média de JAK2%MT	Intra-execuições, DP, %CV	Inter-execuições, intradiária, DP, %CV	Intradiária, DP, %CV	Intercentros, DP, %CV	Total, DP, %CV
Amostra 1	36	95,19	0,995, 1,04	0,000, 0,00	0,541, 0,57	0,000, 0,00	1,130, 1,19
Amostra 2	36	22,83	3,988, 17,47	0,000, 0,00	1,707, 7,48	1,552, 6,80	4,501, 19,72
Amostra 3	36	14,44	2,257, 15,63	1,398, 9,68	0,000, 0,00	1,422, 9,84	2,890, 20,01
Amostra 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: percentagem de mutação JAK2; **N:** número de medições; **DP:** desvio-padrão; **CV:** coeficiente de variação em percentagem

Substâncias interferentes (especificidade analítica)

A estrutura do estudo cumpre os requisitos da norma EP7-A3 "Interference Testing in Clinical Chemistry" (Testes de interferência em química clínica) do NCCLS. No total, foram escolhidas 19 substâncias possivelmente presentes em amostras de sangue devido ao seu possível efeito na PCR (bussulfano, bromidrato de citalopram, cloridrato de paroxetina hemi-hidratado, cloridrato de sertralina, cloridrato de fluoxetina, acetaminofeno [paracetamol], bilirrubina não conjugada, EDTA 2K e EDTA 3K de potássio, EDTA de sódio, Hgb [humana], triglicéridos, lisinopril di-hidratado, hidroxíureia, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, tiotepa, anagrelida e interferão alfa 2b).

Foram também avaliadas substâncias do processo de extração de ADN (QSL1, QSB1, QSW1, QSW2 e PK do QIAsymphony DSP DNA Blood Mini Kit; QIAGEN Protease, etanol, AW1 e AW2 do QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit).

Os resultados obtidos não mostraram efeitos interferentes para estas substâncias.

Tabela 13. Substâncias interferentes

Substância testada	Concentração testada
Bilirubina não conjugada	150,3 µg/mL
Hemoglobina [humana]	2000 µg/mL
Triglicéridos	30 000 µg/mL
Bussulfano	38,4 µg/mL
Bromidrato de citalopram	0,75 µg/mL
Cloridrato de paroxetina hemi-hidratado	1,14 µg/mL
Cloridrato de sertralina	0,67 µg/mL
Cloridrato de fluoxetina	3,87 µg/mL
Acetaminofeno [paracetamol]	200,7 µg/mL
Lisinopril di-hidratado	0,33 µg/mL
Hidroxiureia	28,2 µg/mL
Ácido acetilsalicílico	651,6 µg/mL
Ácido salicílico	0,6 µg/mL
Tiotepa	48 µg/mL
Anagrelida	6 µg/mL
Interferão alfa 2b*	1,8 MU/L
EDTA de potássio (EDTA 2K)	2X (3600 µg/mL)
EDTA de potássio (EDTA 3K) †	1X (1800 µg/mL), 3X (5400 µg/mL)

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 13. Substâncias interferentes (cont.)

Substância testada	Concentração testada
EDTA de sódio (EDTA 2Na) †	1X (3000 µg/ml), 3X (9000 µg/ml)
QSL1	2% do volume total da amostra
QSB1	2% do volume total da amostra
QSW1	2% do volume total da amostra
QSW2	2% do volume total da amostra
proteínase K (PK) ‡	2% do volume total da amostra
proteínase K (PK) ‡	2x o volume restante esperado após o processo de extração 3x o volume restante esperado após o processo de extração
QIAGEN Protease	1,29E-05% do volume total da amostra
Etanol (EtOH)	1,29E-03% do volume total da amostra
Buffer AW1	1,00E-01% do volume total da amostra
Buffer AW2	1,00% do volume total da amostra

* A dosagem recomendada para pacientes com PV é de 3 MU, que se supõe ser distribuída em 5 L de sangue (indivíduo com 80 kg), resultando numa concentração de 0,6 MU/L. Seguindo as recomendações da norma EP7-A2 do NCCLS, esta concentração foi testada três vezes, ou seja, 1,8 MU/L.

† 1x concentração de acordo com o fornecedor

‡ A PK causa um efeito interferente quando testada a 2% do volume total da amostra (improvável que ocorra); testes adicionais confirmaram que a PK é removida durante o processo de extração: não se espera qualquer interferência em condições normais de utilização.

Teste do painel de referência internacional da OMS para JAK2 V617F genômica (NIBSC, código do painel 16/120)

O 1.º painel de referência internacional da OMS para JAK2 V617F genômica desenvolvido pelo National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, código do painel 16/120) foi testado utilizando três lotes do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (três réplicas por nível do painel de referência e por lote de reagentes). As experiências foram realizadas durante três dias por um operador, utilizando um instrumento Rotor-Gene Q 5plex HRM. A concordância entre os resultados do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit e os valores consensuais publicados nas instruções de utilização do painel de referência foi avaliada utilizando uma regressão linear simples (Ordinary Linear Regression, OLR) (declive: 1,003, IC de 95% [0,997; 1,010] – interceção: 0,677, IC de 95% [0,212; 1,289]) e uma regressão de Passing-Bablok (declive: 1,01, IC de 95% [1,00; 1,021] – interceção: 0,00, IC de 95% [-0,02; 0,010]) (Figura 22). A concordância é confirmada, demonstrando a adequação do kit em fornecer dados da JAK2 V617F que estão de acordo com outras técnicas de diagnóstico normalmente utilizadas.

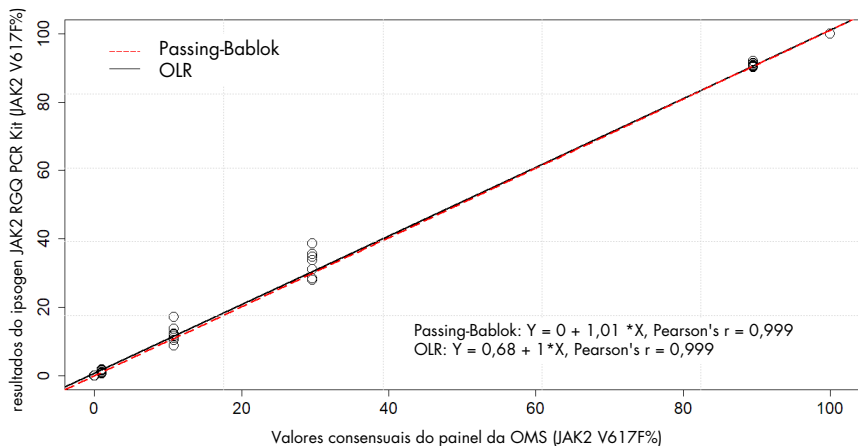


Figura 22. Concordância entre os resultados do ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit e os valores consensuais do painel de referência internacional da OMS para JAK2 V617F genômica (NIBSC, código do painel 16/120). A concordância foi avaliada utilizando uma regressão linear simples (Ordinary Linear Regression, OLR) e uma regressão de Passing-Bablok. O painel abrange sete níveis de JAK2 V617F: 100%, 89,5%, 29,6%, 10,8%, 1,00%, 0,03% e 0%. Os valores consensuais da OMS foram determinados utilizando uma gama de técnicas normalmente utilizadas como parte de um estudo colaborativo internacional; os valores de referência atribuídos a cada nível de JAK2 V617F% são valores medianos (mais informações em <https://www.nibsc.org>).

Veracidade e exatidão

A veracidade da medição está inversamente relacionada com o erro de medição sistemático (erros sistemático [Systematic Error, SE] ou tendência). A tendência foi calculada com base nas instruções da diretriz EP09c do NCCLS para cada nível de JAK2 V617F% do painel de referência, para cada lote de reagentes, bem como para todos os lotes de reagentes (Tabela 14), utilizando os dados do estudo acima descrito. Os valores de tendência mais elevados foram obtidos com o lote 2 do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

A exatidão corresponde à proximidade da concordância entre o resultado de um teste e o valor de referência aceite (neste caso, o valor atribuído a cada nível de JAK2 V617F% do painel da OMS). A exatidão tem em conta tanto a veracidade como a precisão, e é inversamente proporcional ao erro total, calculado como indicado na Tabela 14.

Tabela 14. Erro de medição e tendência

Painel da OMS Código de ampola Valor de referência	Lote de <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Tendência (erros sistemático [Systematic Error, SE]) por lote [IC de 95%]	Tendência (erros sistemático [Systematic Error, SE]) global [IC de 95%]	Erro total (exatidão)
15/172 0%	1	0,000 [N/A]	0,001 [-0,001; 0,004]	0,010
	2	0,003 [-0,011; 0,018]		
	3	0,000 [N/A]		
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]		

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 14. Erro de medição e tendência (cont.)

Painel da OMS Código de ampola Valor de referência	Lote de <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Tendência (erros sistemático [Systematic Error, SE] por lote [IC de 95%])	Tendência (erros sistemático [Systematic Error, SE]) global [IC de 95%]	Erro total (exatidão)
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 [N/A]		
	3	-0,013 [-0,028; 0,001]		

Erro sistemático (Systematic Error, SE): tendência ou erro sistemático, ou seja, a diferença entre a média das medições individuais obtidas com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit ($\bar{V}_{\text{JAK2 Kit}}$) e o valor consensual do painel de referência da OMS (V_{Ref}).

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

O erro total (Total Error, TE) é calculado como $TE = \sqrt{s^2 + SE^2}$, em que s corresponde ao desvio padrão (erro aleatório).

IC de 95%: intervalo de confiança de 95%

N/A: não aplicável

Exatidão analítica

O objetivo deste estudo foi validar a exatidão analítica do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit em condições de utilização normais com amostras clínicas de sujeitos suspeitos de terem neoplasia mieloproliferativa. Este estudo foi realizado com amostras de gDNA extraídas de um total de 473 espécimes: 276 com suspeita de PV, 98 com TE e 99 com MFP. O estado de JAK2 V617F das amostras de pacientes obtidas com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit foi comparado com o estado de JAK2 V617F obtido com o método de referência para a determinação do estado de JAK2, ou seja, uma sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) validada independentemente. Como o limite de detecção (Limit of Detection, LoD) do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit é de 0,042% de JAK2 V617F, o estado de JAK2 V617F de uma amostra de paciente testada com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit é positivo acima ou neste limite e negativo abaixo deste limite. Dos 473 espécimes, 22 espécimes foram positivos para JAK2 com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit enquanto negativos com sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS).

A concordância global é de 95,35% (451/473 indivíduos; IC de 95%: 93,04%, 97,06%). A concordância de positivos foi de 100% (165/165 sujeitos; IC de 95%: 97,79%, 100%) e a concordância de negativos foi de 92,86% (286/308 indivíduos; IC de 95%: 89,39%; 95,47%). Os resultados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Concordância entre o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit e a sequenciação bidirecional de Sanger em população com NMP (populações combinadas com TE, MFP e PV)

		Sequenciação bidirecional de Sanger		
		Positivo para JAK2 V617F	Negativo para JAK2 V617F	Total
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Positivo para JAK2 V617F	165	22	187
	Negativo para JAK2 V617F	0	286	286
	Total	165	308	473

Avaliação dos resultados do estudo de exatidão analítica em coortes de NMP

A concordância entre os resultados obtidos para a mutação JAK2 V617F com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit e com a sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) de Sanger em indivíduos com TE, MFP e PV é apresentada separadamente:

- Para TE, a concordância global é de 89,8% (88/98 indivíduos; IC de 95%: 82,03–95,0%), a concordância de positivos é de 100% (43/43 indivíduos; IC de 95%: 91,78–100%) e a concordância de negativos é de 81,82% (45/55 indivíduos; IC de 95%: 69,1–90,92%).
- Para MFP, a concordância global é de 93,94% (93/99 indivíduos; IC de 95%: 87,27–97,74%), a concordância de positivos é de 100% (51/51 indivíduos; IC de 95%: 93,02–100%) e a concordância de negativos é de 87,5% (42/48 indivíduos; IC de 95%: 74,75–95,27%).
- Para PV, a concordância global é de 97,83% (270/276 indivíduos; IC de 95%: 95,33–99,2%), a concordância de positivos é de 100% (71/71 indivíduos; IC de 95%: 94,94–100%) e a concordância de negativos é de 97,07% (199/205 indivíduos; IC de 95%: 93,74–98,92%).

Os espécimes que produziram resultados discordantes pareciam ter níveis de mutação abaixo da capacidade de detecção por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) (cerca de 10%). Uma vez que a sequenciação de Sanger não é tão sensível como o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, o qual consegue comunicar valores tão baixos quanto 0,042% de JAK2 V617F (ou seja, o valor do limite de detecção [Limit of Detection, LoD]), foi realizado um estudo separado utilizando um método validado de sequenciação de última geração (Next-generation Sequencing, NGS) para detetar o alelo JAK2 V617F nas 15/22 amostras discordantes (nove TE, cinco MFP e uma PV), bem como um conjunto de 22 espécimes concordantes positivos e negativos para JAK2 V617F selecionado aleatoriamente. O estado de JAK2 V617F das amostras de pacientes foi determinado pelo método de sequenciação de última geração (Next-generation Sequencing, NGS) com base no seu limite de sensibilidade analítica (ou seja, entre 1% e 2% de JAK2 V617F). Posto isto, o estado de JAK2 V617F de uma amostra de paciente era positivo se a mutação JAK2 V617F fosse detetada pelo método de sequenciação de última geração (Next-generation Sequencing, NGS) e, reciprocamente, o estado de JAK2 V617F era negativo se a mutação JAK2 V617F não fosse detetada.

Todos os 15 espécimes discordantes testaram positivo pelo método de sequenciação de última geração (Next-generation Sequencing, NGS), concordando com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Todas as amostras concordantes testaram o mesmo com o método de sequenciação de última geração (Next-generation Sequencing, NGS) e em concordância com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit e a sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS). As outras 7 amostras foram consideradas discordantes, uma vez que os dados do método de sequenciação de última geração (Next-generation Sequencing, NGS) não estão disponíveis para estas amostras.

Conclusão do estudo de exatidão analítica

Após reclassificação dos casos discordantes utilizando os resultados do método de sequenciação de última geração (Next-generation Sequencing, NGS), o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit demonstrou 98,3% de exatidão na detecção do alelo JAK2 V617F em espécimes de indivíduos com NMP com níveis de JAK2 V617F $\geq 0,042\%$ (ou seja, o valor do limite de detecção [Limit of Detection, LoD]).

Desempenho clínico

O desempenho clínico do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit no diagnóstico de PV foi avaliado durante um estudo multicêntrico, internacional, prospectivo e interventivo.

O objetivo do estudo foi demonstrar a exatidão do *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit para a detecção da mutação V617F em indivíduos com suspeita de PV. A referência para a determinação do estado de JAK2 foi um método de sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) validado independentemente.

A detecção da mutação JAK2 V617F foi introduzida pela primeira vez nos critérios de referência de 2008 da OMS para o diagnóstico de NMP BCR-ABL negativa, e a presença desta mutação é um dos principais critérios para a confirmação do diagnóstico.(17)

A presença de JAK2 V617F é um dos dois principais critérios de diagnóstico (sendo a PV confirmada se estiverem presentes dois critérios major e um minor, ou o primeiro major e dois minor, de acordo com os critérios de 2008 da OMS*; (para mais informações, consultar a referência 17)

O objetivo foi avaliar a especificidade, a sensibilidade, valor preditivo positivo (VPP), o valor preditivo negativo (VPN) e o rácio de verosimilhança de diagnósticos estabelecidos pelos critérios de diagnóstico de 2008 da OMS*, utilizando a determinação do estado de JAK2 V617F com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit com um limite de corte de 0,042% para positividade (ou seja, o limite de deteção [Limit of Detection, LoD] do kit) ou sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS).

O estudo foi realizado em nove centros de estudo nos EUA (sete indivíduos inscritos), 12 centros de estudo em França (12 indivíduos inscritos), e nove centros de estudo em Itália (cinco indivíduos inscritos). Os indivíduos foram triados e selecionados com base em critérios de inclusão que sugeriam um diagnóstico de PV. Todos os indivíduos inscritos fizeram análises de sangue com o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit e o teste de referência, determinação por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) do estado de JAK2 V617F e do exão 12 de JAK2. Indivíduos com características clínicas compatíveis com o diagnóstico de PV (incluindo aumento da hemoglobina e diminuição dos níveis de eritropoietina [EPO]), mas com determinação negativa para JAK2 V617F e exão 12 por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS), e indivíduos com determinação positiva para JAK2 V617F e exão 12 por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) e níveis normais ou elevados de EPO, foram submetidos a uma biopsia de medula óssea com análise histológica e citogenética, tal como exigido pelo algoritmo de diagnóstico de 2008 da OMS para doenças mieloproliferativas. O diagnóstico final (PV ou não PV) foi estabelecido com base nos resultados dos procedimentos do estudo não investigacional (ou seja, os critérios de 2008 da OMS com determinação da mutação de JAK2 utilizando o ensaio de sequenciação bidirecional [Bi-directional Sequencing, BDS] de referência).

Um total de 216 indivíduos definidos como a população elegível incluiu todos os participantes que satisfizeram com sucesso tanto os critérios de rastreio clínico como os critérios analíticos utilizando o ensaio de sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) de referência. 67 indivíduos não eram elegíveis pelas razões descritas na Tabela 16 (alguns indivíduos não eram elegíveis por mais do que uma razão).

* Como o estudo de desempenho clínico foi iniciado antes da atualização de 2016 dos critérios de diagnóstico da OMS, os critérios de diagnóstico de 2008 da OMS foram utilizados para conduzir este estudo.

Tabela 16. Razões de exclusão da população inscrita

Razão	Número de indivíduos
Falha dos critérios de inclusão ou exclusão	9
Resultados de EPO em falta	22
Biopsia de MO em falta, se necessária para o diagnóstico de PV	26
Positivo para JAK2 V617F por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) e EPO no soro dentro dos limites normais	15
Positivo para exão 12 de JAK2 por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) e EPO no soro dentro dos limites normais	1
Negativo para JAK2 V617F por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) e EPO no soro anormalmente baixo	10
Pacientes não concluíram o estudo e/ou diagnóstico final de PV em falta	15

Para este estudo, foi realizado um total de 221 avaliações de estado de JAK2 V617F (incluindo cinco testes de repetição) utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit no instrumento Rotor-Gene Q MDx (Tabela 17, Tabela 18).

Tabela 17. Resumo dos resultados do teste *ipsogen* JAK2 RGQ PCR (população elegível)

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Total (N=216)
Positivo para JAK2 V617F (\geq LoD, ou seja, 0,042%)	54
Negativo para JAK2 V617F ($<$ LoD, ou seja, 0,042%)	162

Tabela 18. Resumos dos resultados do teste *ipsogen* JAK2 RGQ PCR – População positiva para JAK2 V617F (entre a população elegível)

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Total (N=54)
Valor médio de JAK2 %MT obtido	51,54
Valor mínimo de JAK2 %MT obtido	0,14
Valor máximo de JAK2 %MT obtido	93,43

N: número de amostras; **JAK2 %MT:** percentagem de mutação de JAK2

Avaliação dos resultados do estudo de validação: resultados de desempenho

A comparação dos diagnósticos finais de PV e não PV demonstrou que os dois métodos de diagnóstico eram concordantes: 94,6% dos indivíduos (53/56 indivíduos) diagnosticados com PV pelo investigador foram também diagnosticados com PV utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit e os critérios de diagnóstico da OMS. Do mesmo modo, 95,6% dos indivíduos (153/160 indivíduos) diagnosticados como não PV pelo investigador também foram diagnosticados como não PV utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit e os critérios de diagnóstico da OMS (Tabela 19, Tabela 20).

Os estados de mutação de JAK2 V617F e exão 12 por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) e de JAK2 V617F pelo *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit estão resumidos na Tabela 19. Uma comparação dos diagnósticos de PV e não PV estabelecidos usando cada método de teste é fornecida na Tabela 19.

Tabela 19. Estado de mutação (JAK2 V617F por sequenciação bidirecional, exão 12 de JAK2 por sequenciação bidirecional e *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit) por estado de PV (população elegível)

Variável	PV (N=56)	Não PV (N=160)	Total (N=216)
Estado de mutação de JAK2 V617F por BDS			
Positivos	48 (85,7%)	1 (0,6%)	49 (22,7%)
Negativos	8 (14,3%)	159 (99,4%)	167 (77,3%)
Estado de mutação de exão 12 de JAK2 por BDS			
Positivos	3 (5,4%)	0	3 (1,4%)
Negativos	53 (94,6%)	160 (100,0%)	213 (98,6%)
Estado do <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit			
Positivos	48 (85,7%)	6 (3,8%)	54 (25%)
Negativos	8 (14,3%)	154 (96,3%)	162 (75%)

N: número de pacientes diagnosticados pelo investigador (população avaliada).

Para cada estado de mutação, o número de pacientes é apresentado como uma contagem absoluta e como uma percentagem da população avaliada (entre parênteses).

Tabela 20. Diagnóstico final de PV baseado na opinião do investigador informada por testes bidirecionais e pelos critérios de 2008 da Organização Mundial de Saúde utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit

Diagnóstico final do investigador com base nos critérios da OMS combinados com a avaliação de JAK2 por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS)

Diagnóstico final com base nos critérios da OMS combinados com a avaliação de JAK2 pelo <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	PV (N=56)	Não PV (N=160)	Total (N=216)
PV	53 (94,6%)	1 (0,6%)	54 (25%)
Não PV	1 (1,8%)	153 (95,6%)	154 (71,3%)
Inconclusivos	2 (3,6%)	6 (3,8%)	8 (3,7%)

N: número de pacientes diagnosticados pelo investigador (população avaliada)

Os números são apresentados como uma contagem absoluta e como uma percentagem da população avaliada (entre parênteses).

Casos inconclusivos

Três indivíduos eram do tipo selvagem para JAK2 V617F (ambos com sequenciação bidirecional [Bi-directional Sequencing, BDS] e o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit), para além de terem baixas concentrações de EPO no soro e histologia de medula óssea inconclusiva (dois foram diagnosticados como PV pelo investigador e um como não PV). Cinco indivíduos eram do tipo selvagem para JAK2 V617F por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS) e positivos utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, e nenhum exame de biopsia de medula óssea foi realizado (os cinco foram diagnosticados como não PV pelo investigador). Apesar da ausência ou da histologia de medula óssea inconclusiva, estes oito casos foram incluídos no cálculo da especificidade e sensibilidade (Tabela 21) como discordantes.

Casos discordantes

Para dois indivíduos, o diagnóstico do investigador foi diferente do diagnóstico obtido utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit com base nos critérios de diagnóstico da OMS. Um indivíduo tinha níveis de EPO no soro dentro do intervalo normal (a 16,5 UI/l) e nenhuma mutação JAK2 V617F ou de exão 12. No entanto, o indivíduo foi diagnosticado como positivo para PV de acordo com a opinião do investigador. Um indivíduo tinha níveis de EPO no soro abaixo do intervalo normal e uma mutação JAK2 V617F por sequenciação bidirecional (Bi-directional Sequencing, BDS), mas foi diagnosticado como não PV de acordo com a opinião do investigador. De acordo com o protocolo, o diagnóstico do investigador deveria ter seguido rigorosamente os critérios de diagnóstico de 2008 da OMS. Contudo, nestes dois casos discordantes, os investigadores utilizaram critérios clínicos na interpretação do algoritmo.

No geral, como resumido na Tabela 21, a sensibilidade do diagnóstico de PV utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit foi de 94,64% (53/56 indivíduos; IC de 95%: 85,13%, 98,88%), indicando que é expectável que este ensaio detete PV na grande maioria dos indivíduos com a doença. Da mesma forma, a especificidade do diagnóstico de PV utilizando este ensaio foi de 95,62% (153/160 indivíduos; IC de 95%: 91,19%, 98,22%), indicando que também é expectável que exclua PV na grande maioria dos indivíduos sem PV.

Além disso, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) também foram calculados; o VPP do kit foi de 88,33% (53/60 indivíduos; IC de 95%: 77,27%, 93,57%) e o VPN foi de 98,08% (153/156 indivíduos; IC de 95%: 94,8%, 99,4%).

Tabela 21. Análise de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN (população elegível)

Variável	Estimativa (%)	Limite de confiança inferior a 95% (%)	Limite de confiança superior a 95% (%)
Sensibilidade	94,64	85,13	98,88
Especificidade	95,62	91,19	98,22
VPP	88,33	77,27	93,57
VPN	98,08	94,8	99,4

O rácio de probabilidade de um teste negativo utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit para o diagnóstico de PV, com base nos critérios de diagnóstico da OMS, foi de 21,6 (IC de 95%; 10,44, 44,71), indicando que o resultado positivo para JAK2 V617F é mais provável de ocorrer em indivíduos com PV do que naqueles sem PV.

O rácio de probabilidade de um teste positivo utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit para o diagnóstico de PV, com base nos critérios de diagnóstico da OMS, foi de 0,06 (IC de 95%; 0,02, 0,18), indicando que o resultado negativo para JAK2 V617F é menos provável de ocorrer em indivíduos com PV do que naqueles sem PV.

Conclusão do estudo clínico

É possível retirar as seguintes conclusões das análises:

- A sensibilidade foi de 94,64% (IC de 95%; 85,13%, 98,88%), indicando que o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, com base nos critérios de diagnóstico da OMS, deverá detetar PV na grande maioria dos indivíduos com a doença.
- A especificidade do diagnóstico de PV utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, com base nos critérios de diagnóstico da OMS, foi de 95,62% (IC de 95%; 91,19%, 98,22%), indicando que também é expectável a exclusão de PV na grande maioria dos indivíduos sem PV.
- Utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, com base nos critérios de diagnóstico da OMS, o VPP foi de 88,33% (IC de 95%; 77,27%, 93,57%) * e o VPN foi de 98,08% (IC de 95%; 94,8%, 99,4%).
- O rácio de probabilidade de um teste negativo utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit para o diagnóstico de PV, com base nos critérios de diagnóstico da OMS, foi de 21,61 (IC de 95%; 10,44, 44,71), indicando que o resultado positivo para JAK2 V617F é mais provável de ocorrer em indivíduos com PV do que naqueles sem PV.
- O rácio de probabilidade de um teste positivo utilizando o *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit para o diagnóstico de PV, com base nos critérios de diagnóstico da OMS, foi de 0,06 (IC de 95%; 0,02, 0,18), indicando que o resultado negativo para JAK2 V617F é muito menos provável de ocorrer em indivíduos com PV do que naqueles sem PV.

* O VPP depende da prevalência. Como a prevalência era baixa na população do estudo e a sensibilidade e especificidade são independentes da prevalência, a sensibilidade e especificidade são mais relevantes.

Resumo de segurança e desempenho

O resumo da secção de segurança e desempenho pode ser transferido a partir da página Web do produto *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit: resources.qiagen.com/674623. Além disso, também pode ser encontrado no site da EUDAMED.

Eliminação

- Elimine os resíduos de amostras e dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.
- Todos os produtos químicos e materiais biológicos são potencialmente perigosos. Os espécimes e as amostras são potencialmente perigosos e devem ser tratados como materiais de risco biológico.
- Os resíduos, as placas e os tubos de amostras usados durante a extração de ADN devem ser eliminados de acordo com os regulamentos de segurança locais.
- Os tubos de tiras utilizados durante o protocolo de qPCR devem ser eliminados de acordo com os regulamentos de segurança locais.

Referências

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&MPN-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.

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver quaisquer problemas que possam surgir. Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Apoio Técnico em www.qiagen.com/Support (para obter informações de contacto, visite www.qiagen.com).

Para informações sobre resolução de problemas relativas aos kits de extração QIAamp DNA Blood Mini Kit (n.º de cat. 61104) e QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de cat. 937236), consulte os respetivos manuais; para informações sobre resolução de problemas relativas ao Rotor-Gene AssayManager v2.1, consulte o *Manual do utilizador do Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Comentários e sugestões

Extração automatizada

- | | |
|---|---|
| a) Amostra assinalada com o alarme "unclear" (ambíguo) | O motivo poderá ser uma pausa efetuada durante a execução de extração. Se a execução de extração estava concluída, prosseguir para o passo de medição da concentração e rácio de densidade ótica (Optical Density, OD). Caso contrário, repetir a execução de extração. |
| b) Amostra assinalada com o alarme "unprocessed" (não processado) | Isto refere-se a um erro inicial de volume de amostra. Verificar o volume de sangue mediante pipetagem. Se o volume estiver demasiado baixo, aumentá-lo para que a amostra tenha 300 µl e reiniciar a execução. |
| c) Amostra sinalizada como "invalid" (inválida) | Ocorreu um erro durante a execução de extração. Repetir o passo de extração para esta amostra. |

Comentários e sugestões

- | | | |
|----|--|--|
| d) | Erro de temperatura de bloco de refrigeração | Uma mensagem de erro no final da execução relativamente à temperatura de refrigeração significa que as amostras foram mantidas à temperatura ambiente (15–25 °C) desde o final da execução de extração. Se as amostras tiverem sido mantidas à temperatura ambiente durante <12 horas, a qualidade do ADN genómico não deverá ter sido alterada e o ADN genómico pode ser quantificado. Se >12 horas, as amostras de ADN genómico podem ter ficado degradadas. Se for esse o caso, repetir a extração. |
| e) | Erro de remoção de placa de eluição | No final da execução, pode aparecer uma mensagem de erro se a placa de eluição tiver sido removida sem a verificação da operação relevante no ecrã. Isto pode ser retificado clicando na caixa relevante. |

Manuseamento geral para a avaliação do estado da mutação JAK2, utilizando o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR

O número total de cópias não está em conformidade e a amostra correspondente é inválida: a amplificação é demasiado baixa

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Verificar o rácio A_{260}/A_{280} | Se for <1,7, executar uma nova extração de ADN. |
| b) | Verificar a concentração de ADN | O <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit está otimizado para uma concentração funcional de 10 ng/ μ l. Se a concentração de ADN não estiver nesta concentração, diluir ou extrair novamente ADN do sangue total. |
| c) | Se ambos os parâmetros estiverem em conformidade, os volumes de pipetagem podem estar incorretos | Verificar e recalibrar as pipetas antes de repetir o passo de qPCR. |

Comentários e sugestões

O controlo de execução falha num padrão de quantificação (Quantitation Standard, QS)

- | | |
|--|---|
| a) Inversão do frasco | Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reação. Substituir todos os reagentes críticos e repetir o ensaio com alíquotas novas. Manusear sempre as amostras, componentes do kit e consumíveis de acordo com as práticas comumente aceites para evitar a contaminação por transferência. |
| b) Inversão durante a distribuição | |
| c) Contaminação cruzada | |
| d) Degradação parcial do padrão | |
| e) Reagentes PCR parcialmente degradados | |
| f) Amplificação não específica | Armazenar o conteúdo do kit entre -30 e -15 °C e manter as misturas de reação protegidas da luz.
Evitar um congelamento e descongelamento repetidos. |

Nenhum sinal ou sinal baixo para um padrão

- | | |
|---|--|
| a) Problema de homogeneização | Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reação. |
| b) Utilizar a mesma mistura de reação para padrões de quantificação (Quantitation Standards, QS) de tipo selvagem (Wild-type, WT) e de mutante (Mutant, MT) | Repetir a execução de PCR. |

Comentários e sugestões

Controlo sem modelo (No Template Control, NTC) de água apresenta amplificação positiva

- | | |
|--|---|
| a) Contaminação cruzada | Substituir todos os reagentes críticos. |
| b) Contaminação de reagente | Manusear sempre as amostras, componentes do kit e consumíveis de acordo com as práticas comumente aceites para evitar a contaminação por transferência. |
| c) Inversão dos tubos de tiras (tubos que contêm um modelo positivo para <i>JAK2 V617F</i> inseridos na posição de controlo sem modelo [No Template Control, NTC]) | Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reação.
Manter as misturas de reação protegidas da luz. |
| d) Degradação da sonda | Verificar a existência de falso-positivos na curva de fluorescência. |

Nenhum sinal, mesmo nos controlos padrão

- | | |
|---|--|
| Erro de pipetagem ou reagentes omitidos | Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reação.
Repetir a execução de PCR. |
|---|--|

Ausência de sinais ou sinais baixos em amostras para o controlo interno (Internal Control, IC) e/ou número total de cópias (Total Copy Number, TCN) abaixo do intervalo de validade, mas os controlos de execução estão válidos

- | | |
|---|---|
| Efeitos inibidores do material da amostra provocados por uma purificação insuficiente | Verificar sempre a qualidade do ADN, medindo a concentração e o rácio A_{260}/A_{280} antes de iniciar.
Repetir a preparação do ADN. |
|---|---|

Comentários e sugestões

O controlo de tipo selvagem (Wild-type Control, WTC) é positivo, mas o controlo de mutante (Mutant Control, MTC) não é suficientemente positivo

Contaminação por transferência

Substituir todos os reagentes críticos.

Repetir o ensaio com novas alíquotas de todos os reagentes.

Manusear sempre as amostras, componentes do kit e consumíveis de acordo com as práticas comumente aceites para evitar a contaminação por transferência.

É necessário certificar-se de que as pontas são alteradas entre a pipetagem de reagentes diferentes.

Controlo de tipo selvagem (Wild-type Control, WTC) amplificado com a mistura de reação de mutante (Mutant, MT) (em vez da mistura de reação de tipo selvagem [Wild-type, WT]) e controlo de mutante (Mutant Control, MTC) amplificado com a mistura de reação de tipo selvagem (Wild-type, WT) (em vez da mistura de reação de mutante [Mutant, MT])

a) Contaminação cruzada

Substituir todos os reagentes críticos.

b) Contaminação de reagente

Repetir o ensaio com novas alíquotas de todos os reagentes.

c) Inversão dos tubos (tubos com controlo de tipo selvagem [Wild-type Control, WTC] inseridos na posição de controlo de mutante [Mutant Control, MTC] e vice-versa)

Manusear sempre as amostras, componentes do kit e consumíveis de acordo com as práticas comumente aceites para evitar a contaminação por transferência.

Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reação.

Comentários e sugestões

Detecção invertida do controlo positivo

- a) Contaminação cruzada
- b) Inversão da distribuição da mistura de reação no tubo ou na pré-mistura.

Substituir todos os reagentes críticos e repetir o ensaio com alíquotas novas. Manusear sempre as amostras, componentes do kit e consumíveis de acordo com as práticas comumente aceites para evitar a contaminação por transferência.

Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reação.

Sem sinal para uma amostra ou controlo, incluindo o controlo interno

- a) Mistura de reação ou um dos seus componentes (por ex., polimerase Taq) não adicionado
- b) Mistura de reação degradada

Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reação. Se o controlo interno não for amplificado, significa que a mistura de reação não foi adicionada ou está degradada.

Repetir o passo qPCR com uma nova mistura de reação.

Símbolos

Os seguintes símbolos aparecem nas instruções de utilização ou na embalagem e nos rótulos:

Símbolo

Definição do símbolo



<N>

Contém reagentes suficientes para <N> reações



Prazo de validade



Este produto cumpre os requisitos do Regulamento europeu 2017/746 para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

REF

Número de catálogo

LOT

Número de lote

MAT

Número de material (por ex., rotulagem de componentes)

GTIN

Número global de item comercial

UDI

Identificação única do dispositivo

CONT

Contém

COMP

Componente

NUM

Número

Símbolo

Definição do símbolo

Rn

R refere-se à revisão das Instruções de utilização e n é o número da revisão



Limitação de temperatura



Fabricante



Consultar as instruções de utilização transferíveis de resources.qiagen.com/674623



Proteger da luz



Cuidado, consultar a documentação adjunta

Informações para encomendas

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Para 24 reações: Wild-type JAK2 Gene Control, JAK2 V617F Control Gene, Padrões de quantificação de tipo selvagem de JAK2, Padrões de quantificação de mutante de JAK2, Mistura de reação de tipo selvagem de JAK2, Mistura de reação de mutante de JAK2, polimerase Taq de ADN, tampão TE para diluição, água para NTC	674623
Produtos relacionados		
Rotor-Gene Q MDx – para análise de PCR em tempo real validada para IVD em aplicações clínicas		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de fusão de alta resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal de fusão de alta resolução (High Resolution Melt, HRM), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em peças e mão de obra; instalação e formação não incluídas	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de fusão de alta resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal de fusão de alta resolução (High Resolution Melt, HRM), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em peças e mão de obra; instalação e formação incluídas	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Software para testes de rotina juntamente com o Rotor-Gene Q	9024203

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Software com licença única para instalação num computador	9025620
Loading Block 72 x 0,1ml Tubes	Bloco de alumínio para a preparação manual de reações com pipeta de canal único em 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0,1ml (250)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reações	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10 000 reações	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparações: QIAamp Mini Spin Columns, tampões, reagentes, tubos, VacConnectors	61104
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit	Para 192 preparações de 200 µl cada: inclui 2 cartuchos de reagentes e suportes e acessórios de enzima.	937236
QIAsymphony SP and accessories		
QIAsymphony SP System	Módulo de preparação de amostras QIAsymphony: inclui instalação e formação e 1 ano de garantia em peças e mão de obra	9001751
QIAsymphony SP	Módulo de preparação de amostras QIAsymphony: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Cartuchos de 8 poços para preparação da amostra, para utilização com o QIAsymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers para utilização com o QIAsymphony SP	997004

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Pontas com filtro descartáveis, em suporte; (8 x 128). Para utilização com os instrumentos QIAcube® e QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Pontas com filtro descartáveis, em suporte; (8 x 128). Para utilização com os instrumentos QIASymphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Tubos de polipropileno não esterilizados (0,85 ml de capacidade máxima, menos de 0,7 ml de capacidade de armazenamento, 0,4 ml de capacidade de eluição); 2304 em suportes de 96; inclui tiras de tampas	19588
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 unidades/ml, solução)	19101
Buffer ATL (200 ml)	Tampão de lise de tecido de 200 ml para 1000 preparações	19076

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncias de responsabilidade específicas do produto, consulte as instruções de utilização do respetivo kit QIAGEN. As instruções de utilização do kit QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitadas aos Serviços de Assistência da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

Revisão	Descrição
R1, julho de 2022	Primeira edição

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Contrato de licença limitada do *ipsogen*[®] JAK2 RGQ PCR Kit

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser utilizado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com estas instruções de utilização e recorrendo à utilização exclusiva dos componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para utilizar ou incluir os componentes incluídos neste kit com quaisquer componentes não incluídos neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, nestas instruções de utilização e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este painel e/ou a sua utilização ou utilizações não infringem os direitos de terceiros.
3. Este painel e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, recondicionados ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do painel concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de licença limitada através de qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas judiciais e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de licença limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao painel e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciais: QIAGEN[®], *ipsogen*[®], QIAamp[®], QIAcube[®], QIASymphony[®], HotStarTaq[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®] (QIAGEN Group); SYBR[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.); Sarstedt[®] (Sarstedt AG & Co). Os nomes registados, as marcas comerciais etc., utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados especificamente como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

07-2022 HB-2872-001 1 123592 © 2022 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Encomendas www.qiagen.com/shop | Assistência técnica support.qiagen.com | Website www.qiagen.com