

Gebruiksaanwijzing *ipsogen*[®] JAK2 RGQ PCR Kit



Versie 2



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Voor gebruik in combinatie met het Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-instrument



0197



674623



QIAGEN, GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND



R1 1123592NL

Inhoud

Beoogd gebruik.....	6
Beoogde gebruiker	6
Beschrijving en principe	7
Samenvatting en uitleg	7
Principe van de procedure.....	11
Meegeleverde materialen	16
Inhoud van de kit	16
Inhoud van de kit (vervolg)	17
Bestanddelen van de kit	18
Benodigde, maar niet-meegeleverde materialen	20
Verbruiksartikelen en reagentia voor handmatige DNA-extractie	20
Verbruiksartikelen en reagentia voor geautomatiseerde DNA-extractie.....	20
Verbruiksartikelen en reagentia voor PCR	20
Apparatuur	21
Instrumenten voor monsterbereiding.....	21
Apparatuur voor real-time PCR	21
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	22
Veiligheidsinformatie	22
Informatie voor noodgevallen.....	22
Vorzorgsmaatregelen	23
Opslag en hantering van reagentia	25
Verzendcondities.....	25

Opslagcondities	25
Stabiliteit tijdens gebruik	25
Bewaren en hanteren van specimens	27
Volbloedmonsters	27
Monsters van genomisch DNA	27
Protocol: Extractie van genomisch DNA uit volbloed en bereiding	28
Handmatige extractie van genomisch DNA met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	28
Geautomatiseerde extractie van genomisch DNA met de QIAasymphony DSP DNA Mini Kit	32
Kwalificering en kwantificatie van DNA	38
Normalisatie van monsters van genomisch DNA	38
Protocol: qPCR met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument	39
De Rotor-Gene AssayManager v2.1-basissoftware installeren	40
De Gamma-invoegtoepassing installeren en het assayprofiel importeren	41
Monsterverwerking op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument met rotor voor 72 buisjes	44
qPCR op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument met rotor voor 72 buisjes	47
Interpretatie van de resultaten	61
Beperkingen	69
Prestatiekenmerken	71
Analytische prestaties	71
Tests van de WHO International Reference Panel for Genomic JAK2 V617F (NIBSC, panelcode 16/120)	80

Klinische prestaties	87
Overzicht van veiligheid en prestaties	95
Afvoer	96
Referenties	97
Gids voor problemen oplossen	99
Symbolen	104
Bestelgegevens	106
Revisiegeschiedenis van document	109

Beoogd gebruik

De *ipsogen*[®] JAK2 RGQ PCR Kit is een kwantitatieve in-vitro PCR-assay die is bestemd voor de detectie en kwantificering van de JAK2 V617F/G1849T-mutatie in genomisch DNA, geëxtraheerd uit humaan perifeer volbloed dat is ontsteld met 2K-EDTA. Resultaten die zijn verkregen met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit zijn bedoeld voor gebruik ter aanvulling op evaluatie van vermoed Philadelphia (Ph)-chromosoomnegatief myeloproliferatief neoplasma (MPN) en de monitoring van moleculaire aandoeningen bij MPN-patiënten. Gegeneerde diagnostische resultaten moeten in combinatie met overige klinisch-pathologische bevindingen worden geïnterpreteerd.

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is bedoeld om uitsluitend met het QIAGEN Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-instrument en andere gevalideerde workflow-onderdelen te worden gebruikt, zoals vermeld in de gebruiksaanwijzing. De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is geen geautomatiseerd hulpmiddel. De analyse wordt echter ondersteund door speciaal hiervoor bestemde software.

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is bedoeld voor gebruik voor in-vitrodiagnostiek.

Beoogde gebruiker

Deze kit is bestemd voor professioneel gebruik.

Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door professionals die speciaal zijn opgeleid en getraind in het gebruik van moleculaire biologische technieken en bekend zijn met deze technologie. De hulpmiddelprocedure moet in een molecuair-biologische laboratoriumomgeving worden geïmplementeerd.

Beschrijving en principe

Samenvatting en uitleg

Een terugkerende somatische mutatie, *V617F*, die invloed heeft op het Janus-tyrosinekinase 2 (*JAK2*)-gen, werd ontdekt in 2005 (1–4). Dit betekende een grote doorbraak om MPN te begrijpen, classificeren en diagnosticeren. *JAK2* is een cruciaal intracellulair signaalmolecuul voor een aantal cytokinen, waaronder erytropoëfine.

De *JAK2 V617F*-mutatie is gedetecteerd bij > 95% van de patiënten met polycytemia vera (PV) en bij circa 60% van de patiënten met essentiële trombocytomie (ET) en primaire myelofibrose (PMF) (5). *JAK2 V617F* is ook gedetecteerd bij enkele zeldzame gevallen van chronische myelomonocyttaire leukemie, myelodysplastisch syndroom (MDS), systemische mastocytose en chronische neutrofiele leukemie, maar bij 0% van de patiënten met chronische myeloïde leukemie (CML) (6).

De *JAK2 V617F*-mutatie komt overeen met een enkele nucleotideverandering van *JAK2*-nucleotide 1849 in exon 14, wat resulteert in een unieke substitutie van valine (V) naar fenylalanine (F) op positie 617 van de proteïne (JH2-domein). Het *JAK2*-gen codeert voor tyrosine-kinase die betrokken is bij cytokinereceptor-signalering via de STAT-route. Wanneer het constitutief wordt geactiveerd, meestal door middel van *JAK2 V617F*-mutatie, is het resultaat een transformatie van de erythroïde progenitorcellen, hypersensitiviteit voor erytropoëfine en activatie van downstream signaleringsroutes. Er wordt ook verondersteld dat ontregelde *JAK2* de oncogeenexpressie, mitotische recombinatie en genetische instabiliteit bevordert (7).

Voorheen werd MPN gediagnosticeerd op basis van klinische beenmerghistologie en cytogenetische criteria. De ontdekking van een ziektespecifieke moleculaire marker heeft geleid tot een vereenvoudiging van het proces en een toename in diagnostische nauwkeurigheid. Detectie van de *JAK2 V617F*-mutatie maakt deel uit van de referentiecriteriën die de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) in 2016 heeft gesteld voor de diagnose van BCR-ABL-negatieve MPN (8) (tabel 1). De aanwezigheid van deze mutatie is een belangrijk criterium voor diagnostische bevestiging.

Tabel 1. WHO-criteria voor de diagnose van MPN

Criteria voor een diagnose van PV

- | | |
|---------|---|
| Primair | <ol style="list-style-type: none">1. Hemoglobine (Hgb) > 16,5 g/dL (mannen) of > 16,0 g/dL (vrouwen) of hematocriet > 49% (mannen) of > 48% (vrouwen) of toegenomen massa van rode bloedcellen > 25% boven de gemiddelde normale voorspelde waarde.2. Beenmerg (BM)-biopsie laat hypercellulariteit voor leeftijd zien met groei van drie cellijnen (panmyelose) inclusief prominente erytroïde proliferatie, proliferatie van granulocyten en proliferatie van megakaryocyten met pleomorfe, volwassen megakaryocyten (verschillend in formaat).3. <u>Aanwezigheid van JAK2V617F- of JAK2 exon 12-mutatie</u> |
|---------|---|

Secundair Subnormaal erythropoëtinegehalte in serum

Voor diagnose van PV moet aan alle 3 de belangrijke criteria worden voldaan, of aan de eerste 2 belangrijke criteria en het minder belangrijke criterium †.

† Criteriumnummer 2 (BM-biopsie) is mogelijk niet vereist in gevallen met aanhoudende absolute erythrocytose: hemoglobineniveaus > 18,5 g/dL voor mannen (hematocriet, 55,5%) of > 16,5 g/dL voor vrouwen (hematocriet, 49,5%) indien belangrijk criterium 3 en het minder belangrijke criterium aanwezig zijn. Initiële myelofibrose (aanwezig bij maximaal 20% van de patiënten) kan echter uitsluitend worden gedetecteerd door middel van een BM-biopsie; deze bevinding kan een snellere progressie naar overte myelofibrose (post-PV MF) voorspellen.

Criteria voor een diagnose van ET

- | | |
|---------|--|
| Primair | <ol style="list-style-type: none">1. Aantal bloedplaatjes $\geq 450 \times 10^9/L$2. BM-biopsie laat proliferatie zien van met name de megakaryocytenlijn met een verhoogd aantal vergrote, volwassen megakaryocyten met hypergelobuleerde kernen. Geen significante toename of linksverschuiving van neutrofiële granulopoëse of erythropoëse en zeer zelden een kleine (klasse 1) toename van reticulair vezels3. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor <i>BCR-ABL1</i>⁺ CML, PV, PMF, myelodysplastische syndromen of andere myeloproliferatieve neoplasmata4. <u>Aanwezigheid van JAK2-, CALR- of MPL-mutatie</u> |
|---------|--|

Secundair Aanwezigheid van een klonale marker of afwezigheid van bewijs voor reactieve trombocytose.

Voor diagnose van ET moet aan alle 4 de belangrijke criteria worden voldaan, of aan de eerste 3 belangrijke criteria en het minder belangrijke criterium.

Criteria voor een diagnose van prePMF

- Primair
1. Proliferatie en atypie van megakaryocyten zonder reticulinefibrose > klasse 1, gepaard met toegenomen BM-cellulariteit bijgesteld op basis van leeftijd, granulocytische proliferatie en vaak afgenomen erythropoëse
 2. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor *BCR-ABL1*⁺ CML, PV, ET, myelodysplastische syndromen of andere myeloproliferatieve neoplasmata
 3. Aanwezigheid van *JAK2*, *CALR* of *MPL*-mutatie of, indien deze mutaties afwezig zijn, de aanwezigheid van een andere klonale marker[†] of de afwezigheid van kleine reactieve BM-reticulinefibrose[‡]

Secundair Aanwezigheid van ten minste een van de volgende kenmerken, bevestigd in twee opeenvolgende bepalingen:

- a.) Anemie die niet kan worden toegeschreven aan een comorbide aandoening
- b.) Leukocytose $\geq 11 \times 10^9/L$
- c.) Palpabele splenomegalie
- d.) Lactaatdehydrogenase (LDH) toegenomen tot boven de normale bovengrens van het referentiebereik van de instelling

Voor diagnose van prePMF moet aan alle 3 de belangrijke criteria worden voldaan en aan minimaal 1 minder belangrijk criterium.

† In de afwezigheid van een of meerdere van de 3 belangrijke klonale mutaties, is het zoeken naar de meest frequente bijbehorende mutaties (bijv. *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) behulpzaam bij het vaststellen van de klonale aard van de aandoening.

‡ Kleine (klasse 1) reticulinefibrose is van minder belang dan infectie, auto-immuunziekte of andere chronische ontstekingsstoelstanden, haarcelleukemie of ander lymfoïde neoplasma, metastatische maligniteit of toxische (chronische) myelopathieën.

Criteria voor een diagnose van overte PMF

Primair	<ol style="list-style-type: none">1. Aanwezigheid van proliferatie van megakaryocyten en atypie in combinatie met ofwel reticuline- en/of collageenfibrose, klasse 2 of 3.2. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor ET, PV, <i>BCR-ABL1</i>⁺ CML, myelodysplastisch syndromen of andere myeloproliferatieve neoplasmata3. Aanwezigheid van <i>JAK2</i>-, <i>CALR</i>- of <i>MPL</i>-mutatie of, indien deze mutaties afwezig zijn, de aanwezigheid van een andere klonale marker[†] of de afwezigheid van reactieve myelofibrose[‡]
Secundair	Aanwezigheid van ten minste een van de volgende kenmerken, bevestigd in twee opeenvolgende bepalingen: <ol style="list-style-type: none">a.) Anemie die niet kan worden toegeschreven aan een comorbide aandoeningb.) Leukocytose $\geq 11 \times 10^9/L$c.) Palpabele splenomegalied.) Lactaatdehydrogenase (LDH) toegenomen tot boven de normale bovengrens van het referentiebereik van de instellinge.) Leuko-erytroblastose

Voor diagnose van overte PMF moet aan alle 3 de belangrijke criteria worden voldaan en aan minimaal 1 minder belangrijk criterium.

† In de afwezigheid van een of meerdere van de 3 belangrijke klonale mutaties, is het zoeken naar de meest frequente bijbehorende mutaties (bijv. *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) behulpzaam bij het vaststellen van de klonale aard van de aandoening.

‡ BM-fibrose is van minder belang dan infectie, auto-immuunziekte of andere chronische ontstekingsstoelstanden, haarcelleukemie of ander lymfoïde neoplasma, metastatische maligniteit of toxische (chronische) myelopathiën.

Opmerking: CML: chronische myeloïde leukemie; ET: essentiële trombocytemie; PMF: primaire myelofibrose; PV: polycytemia vera; WHO: Wereldgezondheidsorganisatie

De ontdekking van *JAK2 V617F*-mutatie bij MPN-patiënten heeft bovendien nieuwe therapiedoelen onthuld. Van het monitoren van moleculaire aandoeningen waarbij het draagvlak van de *JAK2 V617F*-mutatie is gemeten, is uitgewezen dat dit nuttig is om de reactie op behandelingen te evalueren en de terugval van patiënten te voorspellen die allogene stamceltransplantatie hebben ondergaan (9). De concepten van moleculaire respons zijn duidelijk vastgesteld door de meest

recente aanbevelingen van European LeukemiaNet (ELN) en de International Working Group Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) (10, 11) en hiernaar wordt verwezen in de richtlijnen van het National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (12) en de European Society of Medical Oncology (ESMO) (5). Volledige moleculaire respons is gedefinieerd als uitroeiing van een reeds bestaande moleculaire abnormaliteit en gedeeltelijke moleculaire respons als een afname van $\geq 50\%$ van het draagvlak van het *JAK2 V617F*-mutantallel (gedeeltelijke respons is uitsluitend van toepassing op patiënten met minimaal 20% draagvlak van *JAK2 V617F*-mutantallel op de baseline) (10,11).

Sinds 2006 zijn er meerdere methoden beschikbaar die in feite zijn gebaseerd op PCR-technieken of sequencing, naarmate in laboratoria testen werden ontwikkeld voor het detecteren van de aanwezigheid en mogelijk ook het kwantificeren van *JAK2 V617F*. Deze testen verschillen qua analytische prestaties, met name op het vlak van precisie en de mate van gevoeligheid. Dit verschil kan gevolgen hebben voor de noodzaak voor beenmerganalyse, de tijd die nodig is om een eindiagnose te stellen en mogelijk de diagnostische prestaties en de prestaties van het monitoren van de moleculaire aandoening.

Vanwege het brede bereik van potentiële fracties van het *JAK2 V617F*-mutantallel die kunnen worden aangetroffen in MPN's (met gehalten van zelfs slechts 1%), worden laboratoria aangemoedigd om *JAK2 V617F*-mutatietests aan te bieden voor hoge analytische gevoeligheid. Geschikte technieken moeten een lage detectielimiet bevatten (minimaal 1% voor diagnose en minimaal 0,1% voor het monitoren van moleculaire aandoeningen) en een hoge reproduceerbaarheid (5,13).

Principe van de procedure

Er zijn verschillende technieken voorgesteld voor het kwantitatief vaststellen van de proportie van enkelvoudige nucleotidepolymorfismen (single nucleotide polymorphisms, SNP's) in DNA-monsters. Enkele daarvan, zoals smeltcurves en sequencing, zijn slechts semikwantitatief. Methoden op basis van de real-time kwantitatieve polymerasekettingreactie (qPCR) genieten de voorkeur vanwege hun grotere gevoeligheid. Het gebruik van een speciaal voor SNP bestemde primer maakt selectieve

amplificatie mogelijk van het mutant-allel (MT) of wildtype-allel (WT) die eenvoudig te detecteren is met een instrument voor real-time qPCR. Dit maakt een gevoeligheid van < 0,1% mogelijk, wat in lijn ligt met de huidige aanvaarde JAK2-grenswaarde van 1% die wordt gebruikt voor klinische positiviteit voor diagnose en de aanbevolen detectielimiet van het draagvlak van het *JAK2 V617F*-allel van $\leq 0,1\%$ om de moleculaire ziekte te monitoren (5,13). Sommige klinische experts beschouwen de aanwezigheid van elke *JAK2 V617F*-hoeveelheid echter als klinisch significant op het moment van diagnose, en daarom is een gevoelige methode als qPCR nodig (14). De *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* is gebaseerd op deze techniek.

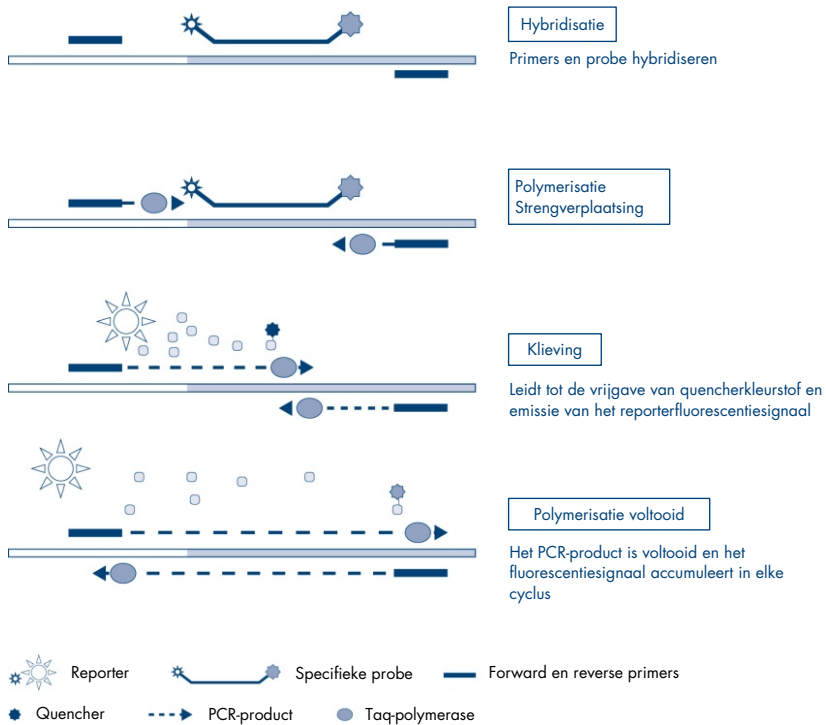
Met qPCR is accurate kwantificatie van PCR-producten mogelijk gedurende de exponentiële fase van het PCR-amplificatieproces. Er kunnen snel kwantitatieve qPCR-gegevens worden verkregen, zonder verwerking na de PCR, dankzij realtime-detectie van fluorescente signalen tijdens en/of post-PCR-cyclus. Zo wordt het risico op contaminatie van het PCR-product drastisch verminderd. Momenteel kan qPCR-analyse worden uitgevoerd met behulp van drie hoofdtechnieken: qPCR-analyse met behulp van SYBR® Green I Dye, qPCR-analyse met behulp van hydrolyseprobes en qPCR-analyse met behulp van hybridisatieprobes.

De QIAGEN-assay benut het qPCR-principe van oligonucleotidehydrolyse. Gedurende de PCR worden forward en reverse primers gehybridiseerd volgens een specifieke sequentie. In hetzelfde mengsel bevindt zich nog een andere aan verfstof gekoppelde oligonucleotide. Deze probe, die bestaat uit een oligonucleotide dat is gemerkt met een 5'-reporterkleurstof en een downstream 3'-kleurstofvrije quencher, hybridiseert tot een doelsequentie in het PCR-product. qPCR-analyse met hydrolyseprobes benut de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase van *Thermus aquaticus* (*Taq*). Als de probe intact is, resulteert de nabijheid van de reporterkleurstof ten opzichte van de quencher in suppressie van de reporterfluorescentie, voornamelijk door Förster-energieoverdracht.

Als het onderzochte doel aanwezig is, zullen gedurende de PCR de forward en reverse primers specifiek hybridiseren aan de probe en deze flankeren. De 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase klieft de probe tussen de reporter en de quencher alleen als de drie oligonucleotiden hybridiseren aan het doel. De probefragmenten worden vervolgens verplaatst van het doel en de polymerisatie van de streng gaat verder. Het 3'-uiteinde van de probe wordt geblokkeerd om extensie van de probe tijdens de PCR te voorkomen (afbeelding 1). Dit proces vindt plaats in elke cyclus en verstoort de exponentiële accumulatie van het product niet.

De toename van het fluorescente signaal wordt alleen gedetecteerd als de doelsequentie complementair is met de primers en probe en zodoende wordt geamplificeerd gedurende de PCR. Vanwege deze vereisten wordt niet-specifieke amplificatie niet gedetecteerd. De fluorescentietoename is daarom direct evenredig aan de doelamplificatie tijdens de PCR.

Bij qPCR wordt het aantal PCR-cycli dat nodig is om een signaal boven de drempelwaarde te detecteren een kruispunt (CP) of cyclusdrempel (CT) genoemd. Dit aantal is direct evenredig aan de doelhoeveelheid die aan het begin van de reactie aanwezig is.



Afbeelding 1. Reactieprincipe. De kwantitatieve allel-specifieke PCR-technologie die in deze assaykit wordt gebruikt, maakt gevoelige, accurate en in grote mate reproduceerbare detectie van SNP's mogelijk. Deze techniek is gebaseerd op het gebruik van specifieke reverse primers voor respectievelijk het wildtype- en V617F-allel (15). Alleen bij perfecte overeenstemming van de primer en het doel-DNA is extensie en amplificatie in de PCR-reactie mogelijk (afbeelding 2).

WT-reactiemengsel



MT-reactiemengsel



Afbeelding 2. Allel-specifieke PCR. Door het mengsel van wildtype- of V617F-primers en een probe is specifieke detectie mogelijk van het wildtype-allel of mutant-allel in twee afzonderlijke reacties die met hetzelfde monster plaatsvinden. Resultaten kunnen worden uitgedrukt als percentage van het aantal mutantkopieën in het totaal aantal JAK2-kopieën. MT: mutant; WT: wildtype.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit
Catalogusnr.

24
674623

Kleur	Identiteit	ID op buis	Volume
Rood	JAK2 Mutant Control (JAK2-mutantcontrole, 100% V617F-allel)	MT Ctrl	33 µl
Groen	JAK2 WT Control (JAK2 WT-controle, 100% wildtype-allel)	WT Ctrl	33 µl
Rood	JAK2 MT Quant Standard 1 (JAK2 MT-kwantificatiestandaard 1, 5×10^1 V617F-kopieën/5 µl)	MT QS1	20 µl
Rood	JAK2 MT Quant Standard 2 (JAK2 MT-kwantificatiestandaard 2, 5×10^2 V617F-kopieën/5 µl)	MT QS2	20 µl
Rood	JAK2 MT Quant Standard 3 (JAK2 MT-kwantificatiestandaard 3, 5×10^3 V617F-kopieën/5 µl)	MT QS3	20 µl
Rood	JAK2 MT Quant Standard 4 (JAK2 MT-kwantificatiestandaard 4, 5×10^4 V617F-kopieën/5 µl)	MT QS4	20 µl
Groen	JAK2 WT Quant Standard 1 (JAK2 WT-kwantificatiestandaard 1, 5×10^1 wildtypekopieën/5 µl)	WT QS1	20 µl
Groen	JAK2 WT Quant Standard 2 (JAK2 WT-kwantificatiestandaard 2, 5×10^2 wildtypekopieën/5 µl)	WT QS2	20 µl
Groen	JAK2 WT Quant Standard 3 (JAK2 WT-kwantificatiestandaard 3, 5×10^3 wildtypekopieën/5 µl)	WT QS3	20 µl

Inhoud van de kit (vervolg)

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit
Catalogusnr.

24
674623

Kleur	Identiteit	ID op buis	Volume
Groen	JAK2 WT Quant Standard 4 (JAK2 WT-kwantificatiestandaard 4, 5×10^4 wildtypekopieën/5 μ l)	WT QS4	20 μ l
Rood	JAK2 MT Reaction Mix (JAK2 MT-reactiemengsel)	MT Mix	1010 μ l
Groen	JAK2 WT Reaction Mix (JAK2 WT-reactiemengsel)	WT Mix	1010 μ l
Mintgroen	Taq DNA polymerase (Taq DNA-polymerase, HotStarTaq® 5 eenheden/ μ l)	Taq	85 μ l
Wit	TE buffer for sample dilution (TE-buffer voor monsterverdunning)	TE	1,9 ml
Wit	Water for no template control (Water voor controle zonder template, NTC)	NTC	1,9 ml
Handleiding ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit (Engels)			1

Bestanddelen van de kit

De belangrijkste componenten van de kit worden hieronder besproken.

Tabel 2. Geleverde reagentia

Reagens	Actieve bestanddelen	Volume
JAK2 Mutant Control (JAK2-mutantcontrole)	Cellijn-DNA met 100% V617F-allel	33 µl
JAK2 WT Control (JAK2 WT-controle)	Cellijn-DNA met 100% wildtype-allel	33 µl
JAK2 MT Quant Standards (JAK2 MT-kwantificatiestandaarden (QS1 tot QS4))	Plasmide met de V617F-allelsequentie	Elk 20 µl
JAK2 WT Quant Standards (JAK2 WT-kwantificatiestandaarden (QS1 tot QS4))	Plasmide met de WT-allelsequentie	Elk 20 µl
JAK2 MT Reaction Mix (JAK2 MT-reactiemengsel)	Oligonucleotiden voor de detectie van het MT-allel en de interne controle, PCR Buffer, MgCl ₂ , dNTPs	1010 µl
JAK2 WT Reaction Mix (JAK2 WT-reactiemengsel)	Oligonucleotiden voor de detectie van het WT-allel en de interne controle, PCR Buffer, MgCl ₂ , dNTPs	1010 µl
Taq DNA polymerase (Taq-DNA-polymerase)	Hot-start Taq DNA Polymerase in storage buffer (Hot-start Taq-DNA-polymerase in opslagbuffer)	85 µl
TE buffer for sample dilution (TE-buffer voor monsterverduunning)	Tris-EDTA-bufferoplossing	1,9 ml
Water for no template control (Water voor controle zonder template, NTC)	Nucleasevrij water	1,9 ml

Reagentia

De reagentia in deze kit, zoals vermeld in tabel 2 hierboven, zijn degene die benodigd zijn om testmonsters naar de gewenste invoer te verdunnen en om de qPCR-reacties uit te voeren voor de detectie van kwantificering van de *JAK2* mutant- en wildtype-allelen, om het mutatiepercentage vast te stellen. De interne amplificatiecontrole die is toegevoegd aan de reactiemengsels wordt gebruikt om qPCR-remming te monitoren en om het mislukken van de PCR-reactie uit te sluiten in het geval van negatieve resultaten.

Controles en standaarden

De kit bevat twee controles: een JAK2-mutantcontrole die wordt gebruikt als een positieve controle voor het JAK2 mutant (MT)-reactiemengsel, en een JAK2 wildtype-controle die wordt gebruikt als een positieve controle voor het JAK2 wildtype (WT)-reactiemengsel. Nucleasevrij water wordt verstrekt om een controle zonder template uit te voeren voor beide reactiemengsels.

De kit bevat vier JAK2 mutant (MT)- en vier JAK2 wildtype (WT)-kwantificatiestandaarden (QS). Ze worden gebruikt om het aantal kopieën van JAK2 MT en WT en dus het *JAK2 V617F*-mutatiepercentage voor de testmonsters te berekenen.

Benodigde, maar niet-meegeleverde materialen

Verbruiksartikelen en reagentia voor handmatige DNA-extractie

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (cat.nr. 61104)
- Ethanol (96–100%)
- **Opmerking:** Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien deze andere substanties bevat, zoals methanol of methylethylketon.

Verbruiksartikelen en reagentia voor geautomatiseerde DNA-extractie

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

Verbruiksartikelen en reagentia voor PCR

- Nucleasevrije, aerosolbestendige, steriele PCR-pipetpunten met hydrofoob filter
- 1.5 ml or 2.0 ml nuclease-free PCR tubes (nucleasevrije PCR-buisjes van 1,5 ml of 2,0 ml)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for the Rotor-Gene Q (stripbuisjes met dopjes, 0,1 ml, voor de Rotor-Gene Q, cat.nr. 981103 of 981106)
- IJs

Apparatuur

- Verstelbare pipetten* bestemd voor PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Wegwerphandschoenen
- Vortexmixer
- Verwarmingsblok voor het lyseren van monsters op 56 °C
- Tafelcentrifuge* met rotor voor reageerbuisjes van 0,5/1,5/2,0 ml (die snelheden van 13.000–14.000 tpm kan halen)
- Spectrofotometer*

Instrumenten voor monsterbereiding

- QIASymphony SP-instrument* (cat.nr. 9001297), softwareversie 4.0 of later, bijbehorende accessoires en het Blood_200_V7_DSP-protocol (of een latere versie)
- Tube Insert 3B (geleidebuisje van 2,0 ml v2, monsterhouder) (24), Qsym, cat.nr. 9242083)

Apparatuur voor real-time PCR

- Real-time PCR-instrument*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (cat.nr. 9002032) of Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (cat.nr. 9002033) en meegeleverde accessoires
- Rotor-Gene AssayManager® softwareversie 2.1.x geïnstalleerd ($x \geq 0$)
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in 1.0.x geïnstalleerd ($x \geq 0$)
- ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR-assayprofiel geïnstalleerd (AP_ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR_V2_0_x.iap ($x \geq 1$))

* Verzeker u er voor gebruik van dat de apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.


Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Onthoud dat u volgens de plaatselijke voorschriften verplicht kunt zijn om ernstige incidenten die hebben plaatsgevonden in verband met gebruik van het hulpmiddel te melden bij de fabrikant en/of diens geautoriseerde vertegenwoordiger en de regelgevende instantie van de locatie waar de gebruiker en/of de patiënt zich bevindt.

Veiligheidsinformatie

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's). Deze zijn online beschikbaar in handige en compacte pdf-indeling op www.qiagen.com/safety, waar u de veiligheidsinformatiebladen voor elke QIAGEN-kit en kitcomponent kunt vinden, bekijken en afdrukken.

- Specimens en monsters kunnen besmettelijk zijn. Gooi afval van het monster en de assay weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.

<p>VOORZICHTIG</p> 	<p>Voeg GEEN bleekmiddel of zuuroplossingen rechtstreeks toe aan het monster of het afval van monsterbereiding.</p>
--	---

Informatie voor noodgevallen

CHEMTREC

Buiten de VS en Canada +1 703-527-3887

Voorzorgsmaatregelen

Voor de uitvoering van qPCR-testen zijn goede laboratoriumtechnieken vereist, waaronder onderhoud van de apparatuur, die geschikt zijn voor moleculaire biologie en die voldoen aan de geldende regelgeving en relevante normen.

Deze kit is bestemd voor in-vitrodiagnostisch gebruik. De reagentia en instructies in deze kit zijn gevalideerd voor optimale prestaties.

- De test is bestemd voor gebruik bij volbloedmonsters ontsteld met kalium-EDTA (K₂-EDTA) en moeten gedurende maximaal 96 dagen voorafgaand aan DNA-extractie worden bewaard bij een temperatuur van 2 °C tot 8 °C.
- Alle chemische en biologische materialen zijn potentieel gevaarlijk. Specimens en monsters zijn potentieel besmettelijk en dienen als biologisch gevaarlijk materiaal te worden behandeld.
- Gooi afval van het monster en de assay weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.
- De reagentia voor de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit zijn optimaal verdund. Verdun reagentia niet verder, omdat dit tot prestatieverlies kan leiden.
- Gebruik geen reactievolumes (reactiemengsel plus monster) van onder de 25 µl.
- Alle reagentia in de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit zijn uitsluitend bestemd voor gebruik met de andere reagentia in dezelfde kit. U kunt geen enkel reagens van de ene kit vervangen door dezelfde reagens van een andere *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, zelfs niet als de kits van dezelfde partij afkomstig zijn, want dit kan invloed hebben op de prestaties.
- Raadpleeg de gebruiksaanwijzing van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument, de gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application, de gebruiksaanwijzing van de Gamma-invoegtoepassing en de gebruiksaanwijzing van het QIA-symphony SP-instrument voor aanvullende waarschuwingen, voorzorgsmaatregelen en procedures.
- Het hanteren van andere incubatietijden of temperaturen kan leiden tot foutieve of strijdige gegevens.
- Gebruik geen componenten na de uiterste gebruiksdatum of die op de verkeerde manier zijn bewaard.

- Reactiemengsels kunnen veranderen als ze worden blootgesteld aan licht.
- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie van de mengsels met de synthetische materialen in de JAK2 MT-kwantificatiestandaard- en JAK2 WT-kwantificatiestandaardreagentia, en met de JAK2-mutantcontrole- en JAK2 WT-controlereagentia.
- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven DNA of PCR-product, die kan leiden tot een fout-positief signaal.
- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie door DNase, die kan leiden tot degradatie van de template-DNA.
- Gebruik afzonderlijke, speciale pipetten om reactiemengsels te maken en templates toe te voegen.
- Open het Rotor-Gene Q MDx-instrument niet totdat de run is voltooid.
- Open Rotor-Gene Q-buisjes niet nadat de run is voltooid.
- Wees extra voorzichtig om te zorgen voor het correct testen van monsters en let op verkeerde invoer van monsters, fouten bij het laden en fouten met de pipetten.
- Verwerk de monsters systematisch, zodat ze gedurende het hele proces kunnen worden geïdentificeerd en traceerbaar zijn.
- We raden het volgende aan:
 - Gebruik nucleasevrije laboratoriumbenodigdheden (zoals pipetten, pipetpunten, reactieflacons) en draag handschoenen wanneer u de assay uitvoert.
 - Gebruik bij alle stappen van het pipetteren ongebruikte aerosol-resistente pipetpunten ter voorkoming van kruisbesmetting van de monsters en reagentia.
 - Bereid een Master Mix vóór PCR met speciaal daarvoor bestemde materialen (pipetten, tips, etc.) in een speciaal daarvoor bestemde ruimte waar geen DNA-matrijzen (DNA, plasmiden of PCR-producten) kunnen worden geïntroduceerd. Voeg de template toe in een afzonderlijke zone (bij voorkeur in een andere ruimte) met specifiek materiaal (pipetten, tips, etc.).

Raadpleeg de bijbehorende handleidingen voor veiligheidsinformatie met betrekking tot de extractiekits QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (cat.nr. 61104) en QIASymphony DSP DNA Mini Kit (cat.nr. 937236).

Opslag en hantering van reagentia

Let op de vervaldatum en opslagcondities die op de verpakking en etiketten van alle componenten staan vermeld. Gebruik geen componenten na de uiterste gebruiksdatum of die op de verkeerde manier zijn bewaard.

Verzendcondities

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit wordt verzonden op droogijs. Als een component van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit bij aankomst niet bevroren is (met uitzondering van het enzym), als de buitenverpakking tijdens het vervoer open is geraakt of als de verzending geen pakbon, handleiding of reagentia bevat, neemt u contact op met een van de afdelingen voor technische services van QIAGEN of met de lokale distributeur (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

Opslagcondities

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit moet direct worden opgeslagen bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C. Gebruik daarvoor een vriezer met een constante temperatuur die is beschermd tegen licht.

Raadpleeg de bijbehorende handleidingen voor opslaginformatie met betrekking tot de extractiekits QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (cat.nr. 61104) en QIASymphony DSP DNA Mini Kit (cat.nr. 937236).

Stabiliteit tijdens gebruik

Als de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit wordt bewaard in de gespecificeerde bewaarcondities, is de kit stabiel tot de vervaldatum die staat vermeld op het etiket op de doos.

Na opening kunnen de reagentia gedurende maximaal 12 maanden in de originele verpakking bij -30 tot -15 °C worden bewaard. Vermijd herhaald ontdooien en invriezen. Houd een maximum van vijf cycli van invriezen en ontdooien aan.

Raadpleeg de bijbehorende handleidingen voor stabiliteitsinformatie met betrekking tot de extractiekits QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (cat.nr. 61104) en QIASymphony DSP DNA Mini Kit (cat.nr. 937236).

- Meng voorzichtig door het buisje tienmaal om te keren en alle buisjes behalve het enzym te centrifugeren voordat u deze openmaakt.
- Houdbaarheidsdata voor elk reagens staan vermeld op de etiketten van de afzonderlijke componenten. Onder goede opslagomstandigheden blijft het product goed presteren gedurende de stabiliteitsduur die op het buisje en het etiket op de verpakking staat vermeld.
- **Opmerking:** Buisjes van verschillende batches mogen niet gemengd worden. Alle componenten uit de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit die voor een test worden gebruikt, moeten uit dezelfde batch afkomstig zijn. Tijdens de procedures voor kwaliteitscontrole van QIAGEN worden op iedere afzonderlijke kitpartij functionele testen uitgevoerd. Meng daarom geen reagentia van verschillende kits, zelfs als deze van dezelfde partij afkomstig zijn.

Bewaren en hanteren van specimens

Volbloedmonsters

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is bestemd voor gebruik met monsters van genomisch DNA geëxtraheerd uit volbloedmonsters ontsteld met kalium-EDTA (K₂-EDTA), ofwel als volgt bewaard:

- Bij 2 °C tot 8 °C gedurende maximaal 96 uur
- Bij 15 °C tot 25 °C gedurende maximaal 96 uur
- Bevroren bij -30 °C tot -15 °C gedurende maximaal 1 maand

Opmerking: Temperatuurwijzigingen tussen opslag op de afnamelocatie en de verzending moeten worden vermeden. De opslagomstandigheden op de testlocatie moeten gelijk zijn aan die van de verzending of lager.

Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk besmettelijk. Gooi afval van het monster en de assay weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.

Monsters van genomisch DNA

Zodra genomisch DNA is geëxtraheerd, kunnen de DNA-monsters gedurende uiterlijk 24 maanden worden opgeslagen en verzonden bij -30 °C tot -15 °C. Cycli van invriezen en ontdooien moeten worden vermeden. Houd een maximum van vier cycli van invriezen en ontdooien aan.

Protocol: Extractie van genomisch DNA uit volbloed en bereiding

Wat u moet weten voordat u begint


- Genomisch DNA dient te worden geëxtraheerd met behulp van de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (cat.nr. 61104) of het QIAsymphony SP-instrument in combinatie met de QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (cat.nr. 937236).
- Zorg ervoor dat de vervaldatum van de reagentia niet is verstreken en dat deze zijn vervoerd en bewaard onder de juiste condities.
- **Opmerking:** De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is uitsluitend gevalideerd in combinatie met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (cat.nr. 61104) of de QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (cat.nr. 937236). Gebruik geen ander DNA-extractieproduct.

Handmatige extractie van genomisch DNA met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Handmatige extractie van genomisch DNA dient te worden uitgevoerd met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (cat.nr. 61104) conform de bijbehorende *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook* (Handleiding voor de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit).

Hantering van reagentia

- Bij het bereiden van de wasbuffers voor dit protocol dient u de gereconstitueerde wasbuffer altijd te mengen door de fles meerdere malen om te keren voordat u aan de procedure begint.
- Gebruik pipetpunten met aerosolfilters bij het pipetteren van elutiebuffer uit de fles en plaats de dop onmiddellijk terug om contaminatie te voorkomen.

- Bij het hanteren van viskeuze vloeistoffen dient u extra voorzichtig te zijn en een geschikte pipet te gebruiken om te garanderen dat de juiste volumes gepipetteerd worden.
- Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt.
-  Voeg QIAGEN Protease (QP) niet rechtstreeks toe aan lysebuffer (AL).

Wat u moet doen voordat u begint

- Laat de bloedmonsters op kamertemperatuur komen (15–25 °C) en controleer of ze goed zijn gehomogeniseerd.
- De lysisbuffer bereiden
Als er zich precipitaat heeft gevormd in de lysisbuffer (AL), lost u deze op door te incuberen op 56 °C.
- QIAGEN Protease bereiden
Voeg 1,2 ml proteaseoplosmiddel (PS) toe aan de flacon met gelyofiliseerde QIAGEN Protease (QP) en meng voorzichtig. Meng de inhoud van de flacon door deze meerdere keren om te keren. Zo voorkomt u dat het mengsel gaat schuimen. Zorg ervoor dat de QIAGEN Protease (QP) volledig wordt opgelost.
Opmerking: Voeg QP niet rechtstreeks toe aan de lysisbuffer (AL).
- Spoelbuffer 1 bereiden
Voeg met behulp van een maatcilinder 25 ml ethanol (96–100%) toe aan de fles met 19 ml wasbuffer 1-concentraat (AW1). Bewaar de gereconstitueerde wasbuffer 1 (AW1) bij kamertemperatuur (15–25 °C).
Opmerking: Meng de gereconstitueerde wasbuffer 1 (AW1) altijd door de fles meerdere malen om te keren voordat u de procedure start.
- Spoelbuffer 2 bereiden
Voeg met behulp van een maatcilinder 30 ml ethanol (96–100%) toe aan de fles met 13 ml wasbuffer 2-concentraat (AW2). Bewaar de gereconstitueerde wasbuffer 2 (AW2) bij kamertemperatuur (15–25 °C).

Opmerking: Meng de gereconstitueerde wasbuffer 2 (AW2) altijd door de fles meerdere malen om te keren voordat u de procedure start.

- De elutiebuffer bereiden

De kit bevat één fles elutiebuffer (AE). Om contaminatie van elutiebuffer (AE) te voorkomen, adviseren wij dringend om pipetpunten met aerosolfilters te gebruiken wanneer u de elutiebuffer (AE) uit de fles pipetteert en om de dop van de fles direct erna weer terug te plaatsen.

- Laat de elutiebuffer (AE) op kamertemperatuur komen (15–25 °C).
- Stel een verwarmingsblok in op 56 °C om te gebruiken in stap 4 van de procedure.

Procedure

1. Pipetteer 20 µl QIAGEN Protease (QP) naar een lysebuisje (LT).

Opmerking: Controleer voor gebruik de vervaldatum van de gereconstitueerde protease.

2. Voeg 200 µl van het bloedmonster toe aan het lysisbuisje (LT).
3. Voeg 200 µl lysisbuffer (AL) toe aan het lysisbuisje (LT), sluit het deksel en meng gedurende 15 seconden met een pulse-vortexmixer.

Opmerking: Voor lysis is het essentieel dat het monster en de lysisbuffer (AL) grondig worden gemengd tot een homogene oplossing.

Opmerking: Aangezien lysisbuffer (AL) een hoge viscositeit heeft, dient u ervoor te zorgen dat u het juiste volume aan lysisbuffer (AL) toevoegt door zorgvuldig te pipetteren en door een geschikte pipet te gebruiken.



Voeg QIAGEN Protease (QP) niet rechtstreeks toe aan lysebuffer (AL).

4. Incubeer bij 56 °C (\pm 1 °C) gedurende 10 minuten (\pm 1 minuut).
5. Centrifugeer het lysisbuisje (LT) gedurende ongeveer 5 seconden op volle snelheid om druppels van de binnenkant van het deksel te verwijderen.
6. Voeg 200 µl ethanol (96–100%) toe aan het lysisbuisje, sluit het deksel en meng grondig gedurende \geq 15 seconden met een pulse-vortexmixer.

7. Centrifugeer het lysisbuisje (LT) gedurende ≥ 5 seconden op volle snelheid om eventuele druppels vloeistof van de binnenkant van het deksel te verwijderen.
8. Breng het volledige lysaat van stap 7 over naar de QIAamp Mini-spinkolom zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt.

Opmerking: Als u meerdere monsters verwerkt, opent u slechts één lysisbuisje (LT) tegelijk.

9. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-spinkolom en centrifugeer deze 1 minuut met ongeveer $6000 \times g$. Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een schoon wasbuisje (WT) en gooi het buisje met het filtraat weg.

Opmerking: Als het lysaat na centrifugeren op $6000 \times g$ (8000 tpm) nog niet volledig het membraan is gepasseerd, centrifugeert u opnieuw op volledige snelheid (maximaal $20.800 \times g$) gedurende 1 minuut.

Opmerking: Als het lysaat tijdens het centrifugeren nog steeds niet het membraan passeert, gooit u het monster weg en herhaalt u de stappen voor isolatie en zuivering met nieuw monstermateriaal.

10. Open de QIAamp Mini-spinkolom voorzichtig en voeg 500 μ l wasbuffer 1 (AW1) toe zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt.
11. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-spinkolom en centrifugeer op ongeveer $6000 \times g$ (8000 tpm) gedurende 1 minuut. Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een schoon wasbuisje (WT) en gooi het buisje met het filtraat weg.
12. Open de QIAamp Mini-spinkolom voorzichtig en voeg 500 μ l wasbuffer 2 (AW2) toe zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-spinkolom niet aan met de pipetpunt.
13. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-spinkolom en centrifugeer deze 1 minuut op volledige snelheid (ongeveer $20.000 \times g$ of 14.000 tpm). Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een schoon wasbuisje (WT) en gooi het buisje met het filtraat weg.
14. Centrifugeer op volledige snelheid (ongeveer $20.000 \times g$, oftewel 14.000 tpm) gedurende 3 minuten om het membraan volledig te drogen.

15. Plaats de QIAamp Mini-spinkolom in een schoon elutiebuisje (ET) en gooi het spoelbuisje (WT) met het filtraat weg. Open voorzichtig het deksel van de QIAamp Mini-spinkolom en breng 50–200 µl elutiebuffer (AE) over naar het midden van het membraan. Sluit het deksel en incubeer gedurende 1 minuut bij kamertemperatuur (15–25 °C). Centrifugeer 1 minuut met ongeveer 6000 × g (8000 tpm) om het DNA te elueren.
16. Gooi gebruikte monsterbuisjes, schaalpjes en afval weg conform uw lokale veiligheidsvoorschriften.


Geautomatiseerde extractie van genomisch DNA met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Geautomatiseerde extractie van genomisch DNA dient te worden uitgevoerd met het QIASymphony-instrument, waarbij de monsterbereidings (SP)-module wordt gebruikt in combinatie met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit (cat.nr. 937236). Volg daarbij de instructies in *QIASymphony DSP DNA Kit Handbook* (Handleiding voor de QIASymphony DSP DNA Kit). Protocoleigenschappen die specifiek van toepassing zijn op gebruik met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit zijn in de onderstaande procedure aangeduid met het teken .

In combinatie met het QIASymphony SP-instrument maakt de QIASymphony DSP DNA Mini Kit geautomatiseerde DNA-zuivering uit humaan volbloed mogelijk (met behulp van het Blood_200_V7_DSP-protocol (of een latere versie) op de QIASymphony SP).

- Er is geen voorafgaande behandeling nodig.
- Buisjes worden rechtstreeks overgebracht naar de QIASymphony SP.
- DNA-zuivering wordt uitgevoerd met magnetische deeltjes.

Wat u moet weten voordat u begint

-  Het te extraheren volume volbloed is 300 µl.

Opstelling

- Zorg ervoor dat u bekend bent met de bediening van de QIASymphony SP. Raadpleeg de gebruikershandleidingen van uw instrument voor bedieningsinstructies.

Hantering van reagentia

- Controleer voordat u de reagenscartridge voor de eerste keer gebruikt of Buffer QSL1 en Buffer QSB1 geen precipitaat bevatten. Verwijder indien nodig de buisjes met Buffer QSL1 en Buffer QSB1 uit de reagenscartridge en incubeer gedurende 30 minuten op 37 °C, waarbij u af en toe schudt om het precipitaat op te lossen. Zorg ervoor dat u de buisjes in de juiste posities plaatst. Als de reagenscartridge al is doorgestoken, moet u ervoor zorgen dat de bakjes zijn verzegeld met afsluitstrips voor hergebruik en moet u de volledige reagenscartridge gedurende 30 minuten incuberen op 37 °C in een waterbad dat u af en toe schudt.
- Vermijd dat u de reagenscartridge (RC) te hard schudt, want dan kan er schuim ontstaan, wat kan leiden tot detectieproblemen met de vloeistof.

Onderhoud

- Optioneel onderhoud van de QIASymphony SP is niet verplicht, maar wordt wel ten zeerste aanbevolen om de kans op contaminatie te verkleinen.

Wat u moet doen voordat u begint

- Controleer voordat u de procedure start of de magnetische deeltjes volledig zijn geresuspendeerd. Vortex de container met de magnetische deeltjes vóór het eerste gebruik krachtig gedurende minimaal 3 minuten.
- Zorg ervoor dat het doorsteekdeksel op de reagenscartridge wordt geplaatst en dat het deksel van het bakje met magnetische deeltjes is verwijderd; of zorg ervoor, als u een gedeeltelijk gebruikte reagenscartridge gebruikt, dat de afsluitstrips voor hergebruik zijn verwijderd.

- Vergeet niet de enzymbuisjes te openen.
- Als de monsters zijn voorzien van een streepjescode, plaats de monsters dan zo in de buisjeshouder dat de streepjescodes naar de streepjescodelezer aan de linkerzijde van de QIASymphony SP zijn gericht.

Procedure



1. Sluit alle lades en de kap.
2. Zet de QIASymphony SP aan en wacht tot het scherm 'Sample preparation' (Monsterbereiding) verschijnt en de opstartprocedure is voltooid.
Opmerking: De aan-uitknop bevindt zich op de linkeronderhoek van de QIASymphony SP.
3. Meld u aan bij het instrument.
4. Controleer of de lade 'Waste' (Afval) goed is voorbereid en voer een voorraadscan uit voor de lade 'Waste' (Afval), inclusief de tipgoot en container voor het vloeibare afval. Vervang indien nodig de afvalzak voor tips.
5. Plaats het benodigde elutierek in de lade 'Eluate' (Eluaat).

Belangrijk: Plaats geen 96-wellsplaat in 'Elution slot 4' (Elutieslot 4).

Gebruik 'Elution slot 1' (Elutieslot 1) uitsluitend met de corresponderende koeladapter.

Opmerking: Als u een 96-wellsplaat gebruikt, dient u ervoor te zorgen dat de plaat in de juiste richting is geplaatst, omdat een verkeerde richting ertoe kan leiden dat monsters in vervolganalyses met elkaar worden verward.

6. Plaats de benodigde reagenscartridge(s) en verbruiksartikelen in de lade 'Reagents and Consumables' (Reagentia en verbruiksartikelen).
Opmerking: Zorg ervoor dat de pipetpunten correct zijn bevestigd.
7. Controleer of de componenten van de lade 'Reagents and Consumables' (Reagentia en verbruiksartikelen) aanwezig zijn.

8.  Breng **300 µl** van het te extraheren volbloedmonster over naar een nucleasevrij microbuisje (2,0 ml type H) en plaats het buisje in de 3b 2 ml-adapter op de monsterbuisjeshouder. Plaats de monsterbuisjes in de lade "Sample" (Monster).
9. Voer met het aanraakscherm de benodigde informatie in voor elke batch monsters die moet worden verwerkt:
- **Monsterinformatie:** Wijzig het standaard buisjesformaat. Om dit te doen, klikt u op **Select All** (Alles selecteren). Selecteer vervolgens **Sarstedt reference 72.694** (Sarstedt-referentie 72.694) uit het tabblad **Tube Insert** (Buisinzet).
 - **Protocol dat moet worden verwerkt:** Klik op **Select All** (Alles selecteren). Klik vervolgens in de categorie op **DNA Blood** (DNA-bloed) > **Blood_200_V7_DSP** (of een latere versie) voor het volbloedmonster.
 -  **Elutievolume en uitvoerpositie:** 100 µl voor het volbloedprotocol.
Opmerking: Nadat u informatie over de batch hebt ingevoerd, verandert de status van '**LOADED**' (Geladen) in '**QUEUED**' (In de wachtrij). Zodra er een partij in de wachtrij staat, wordt de knop **Run** (Verwerken) beschikbaar.

10. Start de run.

10a. Om de run te starten, klikt u op **Run** (Verwerken).

10b. Lees de melding die wordt weergegeven en bevestig deze.

Opmerking: We raden aan om bij het instrument te blijven wachten totdat de vloeistofniveaudetectie van de interne controlebuisjes is voltooid en de status van de QIASymphony SP-houder verandert in **RUNNING** (Bezig met verwerken).

Belangrijk: Onderbreek of stop de run niet tijdens het verwerken (behalve in een noodgeval), aangezien monsters dan worden gemarkeerd als "unclear" (onduidelijk).

Opmerking: Het is mogelijk doorlopend monsters te plaatsen en toe te voegen aan deze run (totdat de reagentia worden geplaatst).

11. Klik op Run (Verwerken) om de zuiveringsprocedure te starten.

12. Na afloop van de protocolrun verandert de status van de batch van '**RUNNING**' (Bezig met verwerken) in '**COMPLETED**' (Voltooid). Haal het elutierek met de gezuiverde nucleïne-zuren uit de lade 'Eluate' (Eluaat).

We raden aan de elutieplaat direct nadat de run is voltooid, te verwijderen van de lade "Eluate" (Eluaat). Afhankelijk van de temperatuur en vochtigheidsgraad kan er sprake zijn van condensatie of verdamping bij elutieplaten die in de QIASymphony SP worden gelaten nadat de run is voltooid.

Opmerking: In het algemeen worden magnetische deeltjes niet overgedragen naar eluaten. Als een eluaat zware deeltjes bevat, kunnen de magnetische deeltjes als volgt worden verwijderd:

- 12a. Breng het buisje met het DNA over naar een geschikte magnetische scheider (zoals QIAGEN 12-Tube Magnet, cat.nr. 36912) totdat de magnetische deeltjes zijn gescheiden.
- 12b. Indien er DNA aanwezig is in de microtiterplaten moet de microtiterplaat op een geschikte magnetische scheider geplaatst worden (bijvoorbeeld de QIAGEN 96-Well Magnet Type A, cat.nr. 36915) totdat de magnetische deeltjes zijn gescheiden. Als u geen geschikte magnetische scheider voorhanden hebt, centrifugeert u het buisje met het DNA gedurende 1 minuut op volledige snelheid in een microcentrifuge om eventuele resterende magnetische deeltjes te pelletiseren.
13. Exporteer het QIASymphony SP-resultatenbestand: dit rapport wordt voor elke elutieplaat gegenereerd.
- 13a. Plaats de USB-stick in een van de USB-poorten aan de voorzijde van de QIASymphony SP.
- 13b. Klik op **Tools** (Hulpmiddelen).
- 13c. Selecteer **File Transfer** (Bestandsoverdracht).
- 13d. Selecteer op het tabblad In-/Output Files (In-/uitvoerbestanden) en klik op **Results Files** (Resultatenbestanden) > **Transfer** (Overdragen).
De naam van het geëxporteerde bestand zou de volgende indeling moeten hebben:
jjjj-mm-dduu:mm:ss_Elutierek-ID

14. Controleer de kolom 'Validity of result' (Geldigheid van resultaat) voor elk monster in het QIASymphony SP-resultatenbestand.
 - **Status Valid (Geldig) en Unclear (Onduidelijk):** Ga verder naar Kwalificering en kwantificatie van DNA.
 - **Status Invalid (Ongeldig):** Monster is geweigerd. Voer de extractiestap opnieuw uit.
15. Als een reagenscartridge slechts gedeeltelijk wordt gebruikt, sluit u deze af met de meegeleverde afsluitstrips voor hergebruik en sluit u buisjes met proteïnase K direct na de protocolrun af met schroefdoppen om verdamping te voorkomen.
16. Gooi gebruikte monsterbuisjes, schaalpjes en afval weg conform uw lokale veiligheidsvoorschriften.
17. Reinig de QIASymphony SP.

Volg de onderhoudsinstructies in de gebruikershandleidingen van uw instrument. Zorg dat u de tipbeveiligingen regelmatig reinigt om het risico van kruisbesmetting tot een minimum te beperken.
18. Sluit de laden van het apparaat en schakel de QIASymphony SP uit.

Kwalificering en kwantificatie van DNA

Voor de kalibratie van de spectrofotometer dient een blanco ATE- of AE-buffer te worden gebruikt. Deze buffers moeten worden gebruikt omdat elutiebuffers die worden gebruikt in extractiekits voor genomisch DNA, het conserveringsmiddel natriumazide bevatten, dat absorbeert bij 260 nm.

- De verhouding A_{260}/A_{280} moet $\geq 1,7$ zijn, aangezien kleinere verhoudingen doorgaans duiden op proteïnecontaminatie of de aanwezigheid van organische chemicaliën en van invloed zijn op de PCR-stap.
- De DNA-kwantiteit wordt bepaald door de optische dichtheid te meten bij 260 nm.
- Totale hoeveelheid gezuiverd DNA = concentratie \times volume van het monster in μl .
- Als de verhouding A_{260}/A_{280} lager is dan 1,7 en/of als de concentratie van genomisch DNA minder is dan 10 ng/ μl , mag het monster niet verder worden verwerkt.

Normalisatie van monsters van genomisch DNA

Het DNA dient te worden verdund tot 10ng/ μl in de TE-buffer uit de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Elke PCR-reactie op de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM is geoptimaliseerd voor 50 ng gezuiverd genomisch DNA verdund in een uiteindelijk monstervolume van 5 μl . In totaal is er 100 ng per getest monster benodigd om de mutant- en wildtype-reacties uit te voeren.

Protocol: qPCR met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument

Wat u moet weten voordat u begint

- De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit moet worden gebruikt met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument in combinatie met Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- Voor de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is specifiek de Gamma-invoegtoepassing vereist. Deze invoegtoepassing kunt u downloaden via de website van QIAGEN: resources.qiagen.com/674623. Deze invoegtoepassing dient te worden geïnstalleerd op een computer waarop versie 2.1 van Rotor-Gene AssayManager is geïnstalleerd.
- Voor de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is bovendien een assayprofiel nodig. Dit assayprofiel (**.iap**-bestand) bevat alle parameters die nodig zijn voor het cycleren en analyseren van de qPCR-assay. Het kan worden gedownload via de webpagina die betrekking heeft op de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit op de website van QIAGEN: resources.qiagen.com/674623. Het assayprofiel moet worden geïmporteerd in versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software.
- Neem de tijd om vertrouwd te raken met het Rotor-Gene Q MDx-instrument voordat u met het protocol begint. Raadpleeg de gebruikershandleidingen van het instrument, Rotor-Gene AssayManager v2.1 en de Gamma-invoegtoepassing voor meer informatie.
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 maakt geautomatiseerde interpretatie van de PCR-resultaten mogelijk. De cyclingparameters worden vergrendeld voor de run.

Opstelling

- Download en installeer de Rotor-Gene AssayManager v2.1. Zie 'De Rotor-Gene AssayManager v2.1-basissoftware installeren' op pagina 40 voor gedetailleerde informatie.

- Download en installeer de Gamma-invoegtoepassing. Zie 'De Gamma-invoegtoepassing installeren en het assayprofiel importeren' op pagina 41 voor gedetailleerde informatie.
- We raden aan om acht monsters van genomisch DNA te testen in dezelfde proef om zo het gebruik van de controles, standaarden en reactiemengsels te optimaliseren. Zie 'Monsterverwerking op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument met rotor voor 72 buisjes' op pagina 44 voor gedetailleerde informatie.

De Rotor-Gene AssayManager v2.1-basissoftware installeren

Op de computer die is aangesloten op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument moet Rotor-Gene AssayManager v2.1-software zijn geïnstalleerd. Deze kunt u downloaden via de website van QIAGEN: resources.qiagen.com/674623. Voor meer informatie over de installatie van de Rotor-Gene AssayManager-basissoftware v2.1, met inbegrip van de computervereisten, raadpleegt u de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1).

Opmerking: De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit kan alleen worden verwerkt wanneer bepaalde configuratie-instellingen worden ingesteld in de Rotor-Gene AssayManager v2.1-software.

Voor de veiligheid van het gehele systeem moeten de volgende vereiste configuratie-instellingen worden gedefinieerd voor de gesloten modus:

- 'Material number required' (Materiaalnummer vereist)
- 'Valid expiry date required' (Geldige vervaldatum vereist)
- 'Lot number required' (Partijnummer vereist)

De Gamma-invoegtoepassing installeren en het assayprofiel importeren

Het installeren van de Gamma-invoegtoepassing en het importeren van het assayprofiel worden beschreven in *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1) en de *Gamma Plug-in User Manual* (Gebruikershandleiding van de Gamma-invoegtoepassing).

De Gamma-invoegtoepassing installeren


1. Download de Gamma-invoegtoepassing en de nieuwste versie van het assayprofiel *ipsogen JAK2 CE IVDR* via de website van QIAGEN.
2. Dubbelklik op het bestand **RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_x** .msi (waarbij $x \geq 0$). Volg de installatie-instructies.

Voor een gedetailleerde beschrijving van dit proces raadpleegt u het gedeelte 'Installing plug-ins' (Invoegtoepassingen installeren) in de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1).

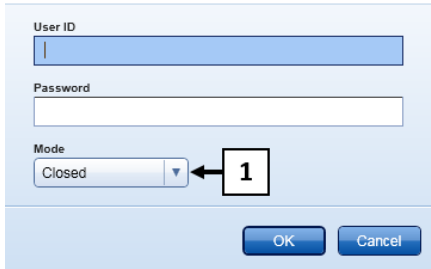
Opmerking: Klik op het tabblad Settings (Instellingen) en schakel de selectievakjes **Material number required** (Materiaalnummer vereist), **Valid expiry date required** (Geldige vervaldatum vereist) en **Lot number required** (Partijnummer vereist) in voor de gesloten modus (zie paragraaf Werklijst), zodat de procedure systeembreed veilig verloopt. Als deze niet zijn ingeschakeld, klik u erop om ze in te schakelen.

3. Nadat de invoegtoepassing is geïnstalleerd, moet een gebruiker met administratorrechten voor de Rotor-Gene AssayManager v2.1-software het assayprofiel *ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR* importeren.

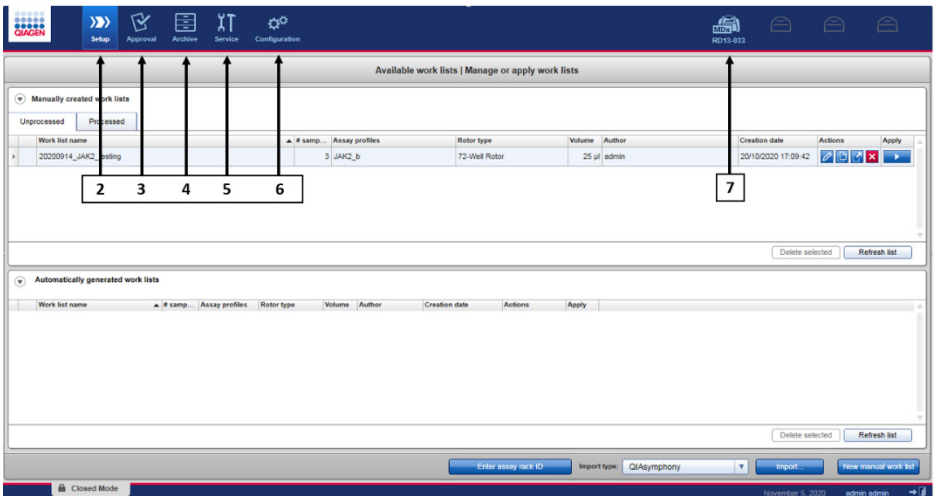
Het assayprofiel *ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR* importeren

1. Klik op het pictogram  voor Rotor-Gene AssayManager v2.1 om de software te openen.
2. Meld u aan als gebruiker met administratorrechten in de modus Closed (Gesloten) (afbeelding 3).

Het aanmeldvenster wordt geopend (afbeelding 4).

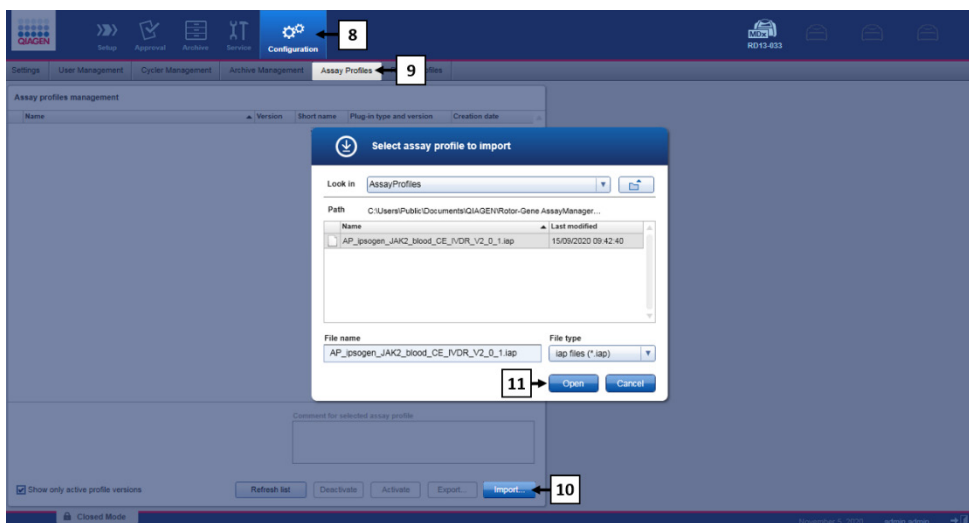


Afbeelding 3. Aanmeldvenster van de Rotor-Gene AssayManager. 1: Modus Closed (Gesloten).



Afbeelding 4. Rotor-Gene AssayManager v.2.1. 2: Omgeving Setup (Instellen). Gebruikt voor het aanmaken, beheren en toepassen van werkljsten. 3: Omgeving Approval (Goedkeuring). Gebruikt om te zoeken op niet-vrijgegeven of gedeeltelijk vrijgegeven experimenten en op goedkeuring van de desbetreffende samples. Experimentrapporten worden na vrijgave van een sample aangemaakt. 4: Omgeving Archive (Archief). Gebruikt om te zoeken op volledig en gedeeltelijk vrijgegeven experimenten en om experimentrapporten te genereren met vooraf gedefinieerde rapportprofielen. 5: Omgeving Service. Bevat de tabbladen Audit Trail (Audittrail) en Re-usable Data (Herbruikbare gegevens). 6: Configuration (Configuratie). Gebruikt om de instellingen van Rotor-Gene AssayManager aan te passen. 7: Rotor-Gene Q-pictogram. Gebruikt om een run te stoppen of beëindigen en een cycler vrij te geven nadat een run is beëindigd (en om de instrumentverbinding te controleren).

- Klik op de omgeving Configuration (Configuratie) (Afbeelding 4, vak 6) (Afbeelding 5, vak 8).
- Klik op het tabblad Assay Profiles (Assayprofielen) (Afbeelding 5, vak 9).
- Klik op **Import** (Importeren) (Afbeelding 5, vak 10).
- Selecteer in het dialoogvenster Select assay profile to import (Selecteer assayprofiel om te importeren) het assayprofiel ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR. Klik op **Open** (Openen) (Afbeelding 5, vak 11).



Afbeelding 5. Assayprofiel importeren. 8: Omgeving Configuration (Configuratie), 9: Tabblad Assay profile (Assayprofiel), 10: Knop Import (Importeren), 11: Knop Open (Openen).

- Nadat het assayprofiel is geïmporteerd, kan het worden gebruikt in de omgeving Setup (Instellen) (Afbeelding 4, vak 2).

Opmerking: Het is niet mogelijk twee keer dezelfde versie van een assayprofiel te importeren.

Monsterverwerking op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument met rotor voor 72 buisjes

We raden aan om acht monsters van genomisch DNA te testen in dezelfde proef om zo het gebruik van de controles, standaarden en reactiemengsels te optimaliseren.

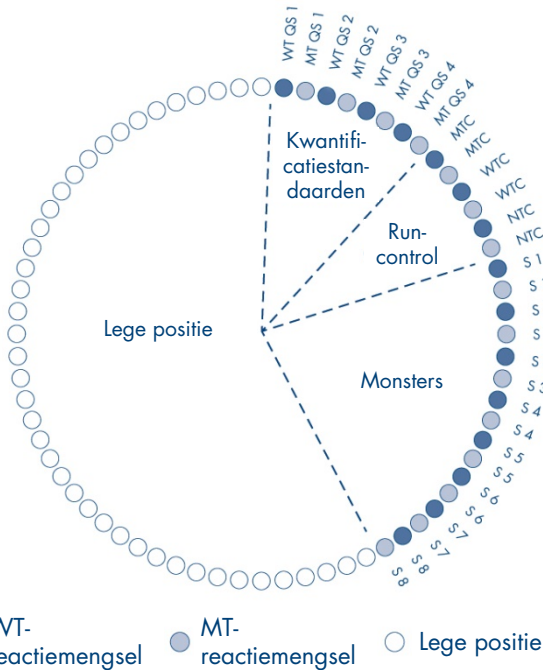
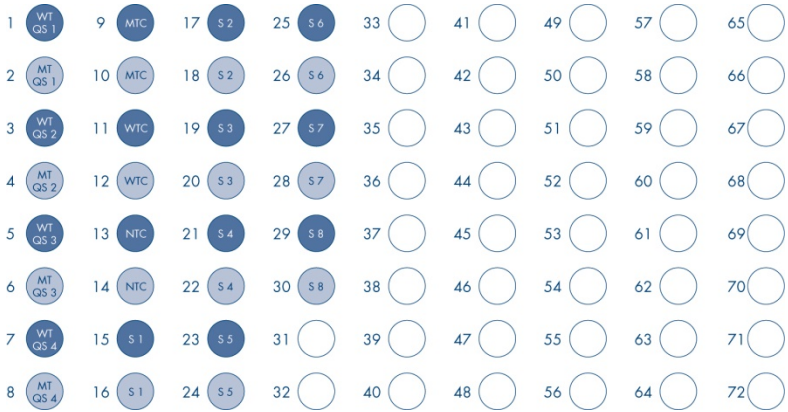
In tabel 3 staat het aantal reacties vermeld dat kan worden verwerkt met de rotor voor 72 buisjes.

Het schema in afbeelding 6 toont een voorbeeld van de instelling van het laadblok en de rotor voor een experiment met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

De plek in het laadblok en de uiteindelijke plek in de rotor worden aangegeven met een getal.

Tabel 3. Aantal reacties voor het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument met rotor voor 72 buisjes

Monsters	Aantal reacties
Met JAK2 MT-reactiemengsel	
8 monsters van genomisch DNA	8
JAK2 MT-kwantificatiestandaarden (mutant)	4
JAK2 MT-controle (mutant)	1
JAK2 WT-controle (wildtype)	1
Water voor controle zonder template (NTC)	1
Met JAK2 WT-reactiemengsel	
8 monsters van genomisch DNA	8
JAK2 WT-kwantificatiestandaarden (wildtype)	4
JAK2 MT-controle (mutant)	1
JAK2 WT-controle (wildtype)	1
Water voor NTC	1



Afbeelding 6. Instelling van de plaat en rotor voor een proef met de ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit. WTC: JAK2 WT-controle; MTC: JAK2 mutant (MT)-controle; WT-QS: JAK2 WT-kwantificatiestandaarden; MT-QS: JAK2 MT-kwantificatiestandaarden; S: monster van gemengd DNA; NTC: controle zonder template (water).



Buisjes dienen in de rotor te worden geplaatst zoals aangeduid in afbeelding 6, aangezien de geautomatiseerde analyse die in het assayprofiel is ingesteld, is gebaseerd op deze ordening. Als een andere indeling wordt gebruikt, zullen afwijkende resultaten het gevolg zijn.

Opmerking: Alle ongebruikte posities moeten worden gevuld met lege stripbuisjes die zijn voorzien van een dop.

qPCR op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument met rotor voor 72 buisjes

Wat u moet doen voordat u begint:

- Maak een werklIJst voor de monsters die u wilt verwerken.

Een werklIJst aanmaken

1. Zet het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument aan.
2. Open de Rotor-Gene AssayManager-software v2.1 en meld u aan als gebruiker met de operatorrol in de modus Closed (Gesloten) (afbeelding 3, vak 1).
3. Controleer of het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument op de juiste manier door de software wordt gedetecteerd alvorens u de run start (afbeelding 7).



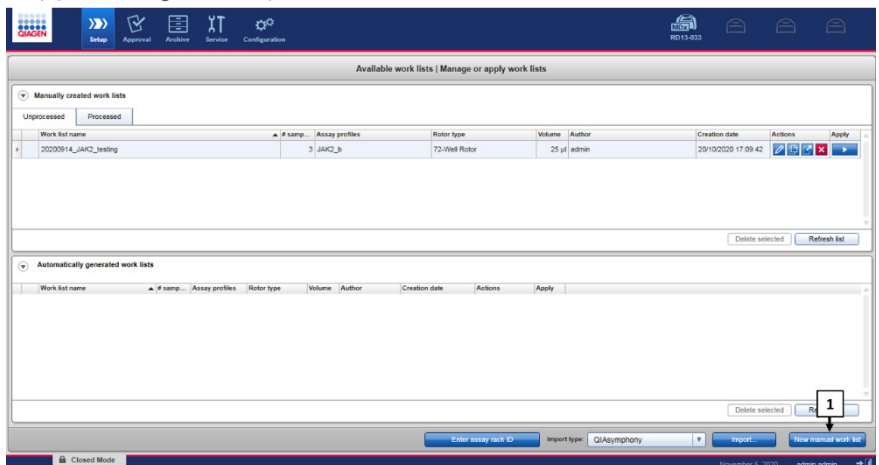
Niet verbonden



Verbonden

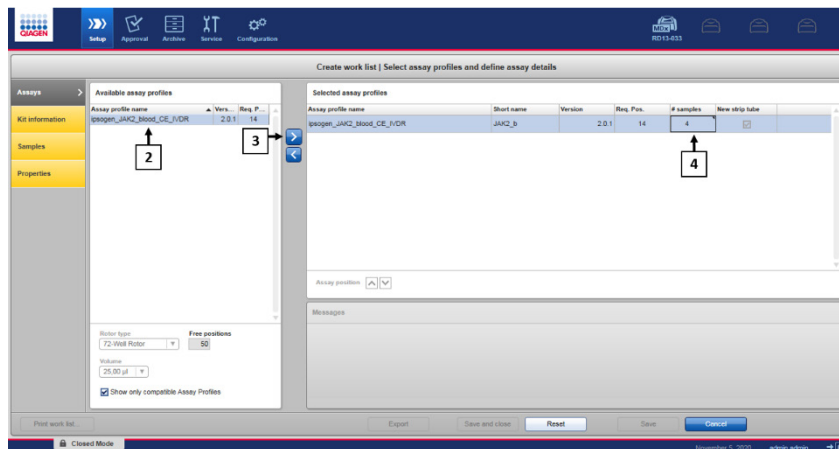
Afbeelding 7. Rotor-Gene Q-verbindingstatus.

4. Klik op 'New manual work list' (Nieuwe handmatige werklIJst) in de omgeving Setup (Instellen) (afbeelding 8, vak 1).



Afbeelding 8. WerklIJst aanmaken. 1: Knop voor het aanmaken van een nieuwe werklIJst.

5. Selecteer het assayprofiel 'ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR' uit de lijst met beschikbare assayprofielen in de stap 'Assay' (afbeelding 9, vak 2).



Afbeelding 9. Werklijst aanmaken – Assayprofiel selecteren. 2: Beschikbare assayprofielen. 3: Assayprofiel overdragen naar werkljst. 4: Aantal monsters invoeren.

6. Klik op '>' om het geselecteerde assayprofiel te verplaatsen naar de lijst **Selected assay profiles** (Geselecteerde assayprofielen) (afbeelding 9, vak 3). Het assayprofiel wordt nu weergegeven in de lijst '**Selected assay profiles**' (Geselecteerde assayprofielen).
7. Geef het aantal monsters op in het daarvoor bestemde veld (afbeelding 9, vak 4).
8. Klik op de stap 'Kit Information' (Informatie over de kit) en voer de volgende informatie over de JAK2-kit handmatig in, die u vindt op het deksel van de doos:
- Material number (Materiaalnummer) 1120216 (afbeelding 10, vak 6)
 - Valid expiry date (Geldige vervaldatum) (afbeelding 10, vak 7)
 - Lot number (Partijnummer) (afbeelding 10, vak 8)

Opmerking: Eventueel kan de streepjescode van de kit (afbeelding 10, vak 5) worden ingevoerd of gescand.

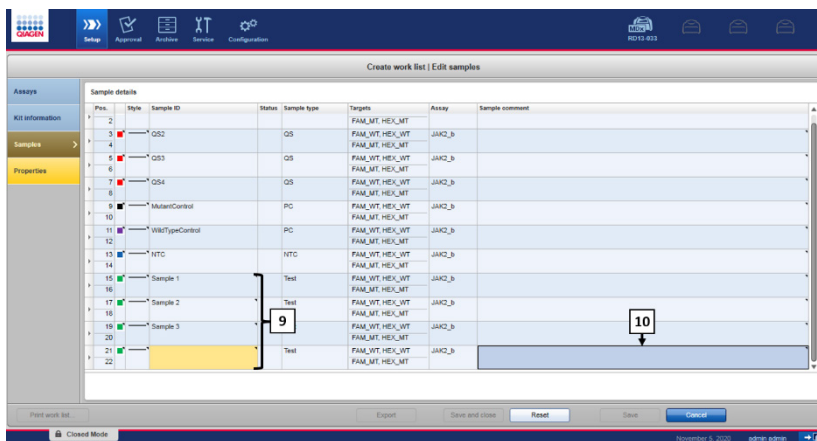
Opmerking: Alle velden moeten worden ingevuld. Velden kunnen blauw worden wanneer geldige informatie wordt ingevoerd (bijv. kit niet vervallen, geldig materiaal- en partijnummer ingevoerd).

Afbeelding 10. Werklijst aanmaken - Informatie over de kit invoeren. 5: Streepjescode van de kit (kan worden gescand of handmatig worden ingevoerd; indien de streepjescode wordt ingevoerd, worden de overige velden automatisch ingevuld). 6: Material number (Materiaalnummer). 7: Kit expiry date (Vervaldatum kit). 8: Lot number (Partijnummer). Deze informatie staat vermeld op de verpakking van de kit.

9. Klik op de stap 'Samples' (Monsters).

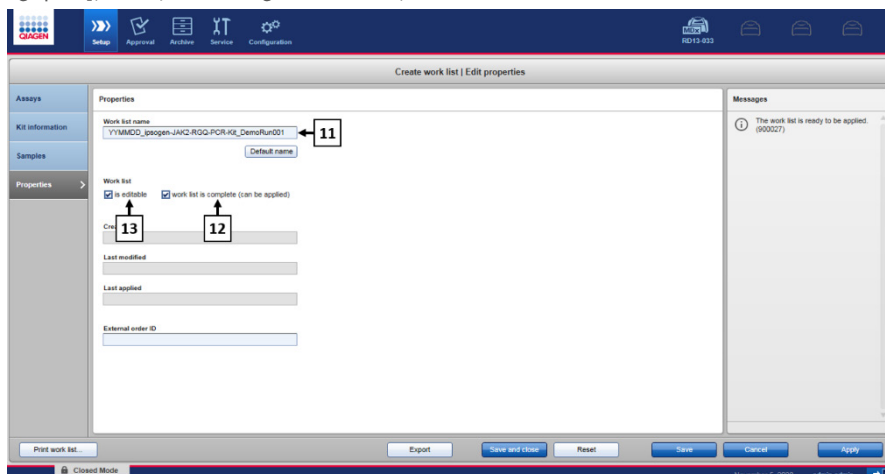
Er wordt een lijst met monsterdetails weergegeven. Deze lijst staat voor de verwachte indeling van de rotor.

10. Geef de monster-identificatienummers (ID's) (afbeelding 11, vak 9) op in deze lijst. Voer eventueel ook extra informatie (afbeelding 11, box 10) en opmerkingen over de monsters in.



Afbeelding 11. Werklijst aanmaken - Informatie over het monster invoeren. 9: Sample ID (Monster-ID).
10: Opmerkingen bij het monster (optioneel).

11. Klik op de stap 'Properties' (Eigenschappen). Voer een naam voor de werklijst in (afbeelding 12, vak 11).
12. Vink het vakje 'work list is complete (can be applied)' (werklijst is ingevuld [kan worden toegepast]) aan (afbeelding 12, vak 12).



Afbeelding 12. Werklijst aanmaken – Eigenschappen. 11: Naam van werklijst. 12: Vink de optie 'work list is complete' (werklijst is ingevuld) aan. 13: Verwijder het vinkje in het vakje 'is editable' (kan worden bewerkt) alleen als de werklijst niet meer wordt gewijzigd.

Opmerking: Met het selectievakje '**is editable**' (kan worden bewerkt) (afbeelding 12, vak 13) kunt u aangeven of de werklijst nog bewerkt kan worden of niet. Indien de werklijst toepasselijk is en later niet meer zal worden bewerkt, verwijdert u het vinkje voor het selectievakje **is editable** (kan worden bewerkt).

13. Sla de werklijst op.

14. U kunt de werklijst afdrukken als hulpmiddel bij het voorbereiden en configureren van de qPCR. Als u de werklijst wilt afdrukken, klikt u op '**Print work list**' (Werklijst afdrukken). De monsterdetails maken deel uit van deze werklijst.

Opmerking: De werklijst kan worden opgeslagen en later worden verwerkt of kan worden aangemaakt tijdens het laden van het experiment op het instrument en direct worden toegepast.

Procedure

Het qPCR-experiment configureren

1. Ontdooi alle benodigde componenten, behalve de *Taq*-DNA-polymerase. Deze moet u in de vriezer bewaren wanneer deze niet wordt gebruikt. Plaats de buisjes met componenten die u wilt ontdooien op ijs.

Belangrijk: Ontdooi niet langer dan 30 minuten om degradatie van het materiaal te voorkomen.

2. Reinig het gedeelte van de tafel waar u het PCR-mengsel bereidt om contaminatie van de template of nucleasen te voorkomen.

3. Meng alle buisjes met standaarden, controles en reactiemengsels voorzichtig door ze tienmaal om te keren en kort te centrifugeren voorafgaand aan gebruik.

4. Bereid de volgende qPCR-Master Mixes op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Opmerking: Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 4 en tabel 5 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één MT- en één WT-reagensmengsel, berekend voor uiteindelijke reactievolumes van 25 µl. Extra volumes zijn opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten en maken 8 monsters en controles mogelijk.

Tabel 4. Bereiding van qPCR-Master Mixes voor de detectie van JAK2 MT-sequenties

Component	1 reactie (µl)	15 + 1* reacties (µl)	Uiteindelijke concentratie
JAK2 MT-reactiemengsel	19,8	316,8	1x
Taq-DNA-polymerase	0,2	3,2	1x
Monster (toevoegen in stap 6)	5	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	–

* Een extra reactievolume is opgenomen als dood volume.

Tabel 5. Bereiding van qPCR-Master Mixes voor de detectie van JAK2 WT-sequenties

Component	1 reactie (µl)	15 + 1* reacties (µl)	Uiteindelijke concentratie
JAK2 WT-reactiemengsel	19,8	316,8	1x
Taq-DNA-polymerase	0,2	3,2	1x
Monster (toevoegen in stap 6)	5	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	–

* Een extra reactievolume is opgenomen als dood volume.

Belangrijk: Vortex en centrifugeer het qPCR-Master Mix kort voordat u 20 µl aan elk stripbuisje toevoegt.

- Voeg de watercontrole zonder template (NTC) toe aan de bijbehorende buisjes en sluit ze.

6. **Belangrijk: Vortex en centrifugeren** DNA kort (monster van genomisch DNA plus QS en controles). Voeg vervolgens 5 µl van het te kwantificeren materiaal toe aan het desbetreffende buisje voor een totaalvolume van 25 µl. Meng de inhoud voorzichtig door de pipet op en neer te bewegen.

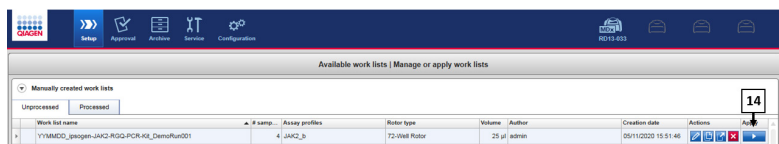
Opmerking: Verwissel voor elk buisje de tips, zodat u niet-specifieke contaminatie van de template of het reactiemengsel voorkomt en zodoende fout-positieve resultaten voorkomt. Voeg eerst de testmonsters toe en daarna de standaarden en controles.

7. Plaats alle componenten van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit terug in de vriezer om te voorkomen dat het materiaal degradeert.

Starten van de run

1. Bereid de Rotor-Gene Q MDx voor en start als volgt een run.
 - 1a. Plaats een rotor met 72 putjes op de Rotor-Gene Q MDx-rotorhouder.
 - 1b. Vul de rotor met stripbuisjes conform de toegewezen posities. Start daarbij bij positie 1, zoals staat aangeduid in afbeelding 6 (pagina 45). In alle ongebruikte posities dienen lege stripbuisjes met dop te worden geplaatst.

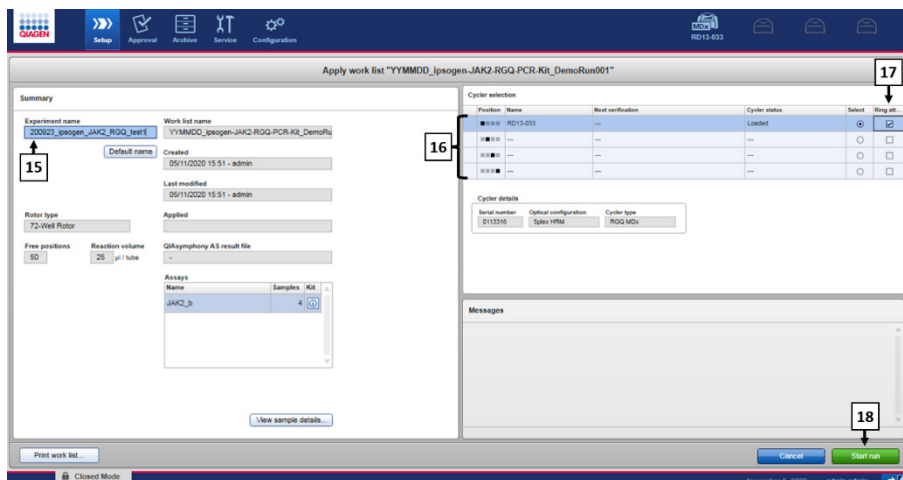
Opmerking: Zorg ervoor dat het eerste buisje op positie 1 wordt geplaatst en dat de stripbuisjes in de juiste richting worden geplaatst op de posities die in afbeelding 6 worden weergegeven.
 - 1c. Bevestig de borgring.
 - 1d. Laad het Rotor-Gene Q MDx-instrument met de rotor en de borgring en sluit het deksel van het instrument.
 - 1e. Selecteer in de Rotor-Gene AssayManager-software v2.1 de desbetreffende werklijst in het werklijstoverzicht en klik op '**Apply**' (Toepassen) (afbeelding 13, vak 14); als de werklijst nog open is, kunt u direct op '**Apply**' (Toepassen) klikken.



Afbeelding 13. Run-configuratie – Werklijst selecteren. 14: Knop 'Apply' (Toepassen).

Opmerking: Meld u aan bij Rotor-Gene AssayManager v2.1 en volg het proces in 'Een werklijst aanmaken' op pagina 47 als er nog geen werklijst speciaal voor het experiment is gemaakt, voordat u als volgt verdergaat.

- Voer de naam van het experiment in (afbeelding 14, vak 15).
- Selecteer in de lijst **Cycler selection** (Cycler selecteren) de cycler die moet worden gebruikt (afbeelding 14, vak 16).
- Controleer of de borging correct is aangebracht en bevestig op het scherm dat de borging is aangebracht (afbeelding 14, vak 17).
- Klik op '**Start run**' (Run starten) (afbeelding 14, vak 18).



Afbeelding 14. Run-configuratie – Run-instellingen. 15: Naam van experiment. 16: Cycler selection (Cycler selecteren). 17: Controleer en bevestig of de borging is bevestigd. 18: Knop Start run (Run starten).

1f. De JAK2 RGQ PCR-run start.

De run beëindigen, vrijgeven en goedkeuren

1. Als de run is beëindigd, klikt u op **'Finish run'** (Run beëindigen).

Opmerking: Het experiment wordt pas opgeslagen in de interne database wanneer deze stap is voltooid.

Opmerking: De analyse van de verkregen gegevens wordt automatisch uitgevoerd, afhankelijk van de met het assayprofiel overeenkomende plug-in en de door het assayprofiel gedefinieerde regels en parameterwaarden.

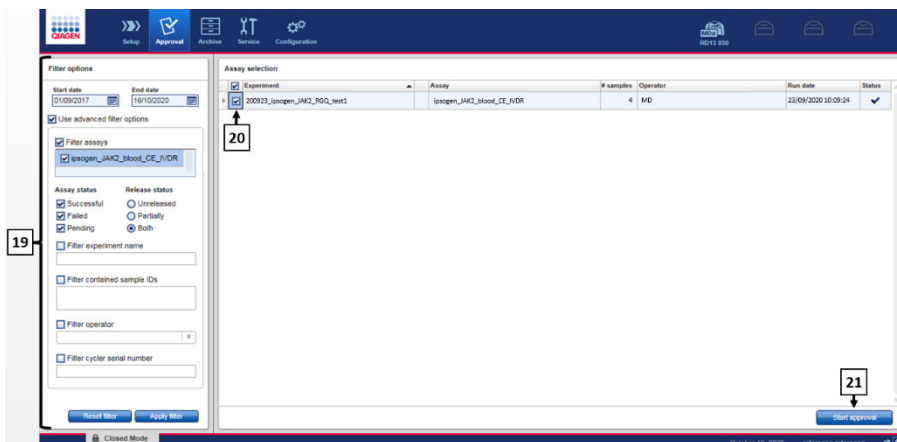
2. Geef de run vrij en keur deze goed.

- Een gebruiker die is ingelogd met de rol Approver (Goedkeurder) kan op **'Release and go to approval'** (Vrijgeven en naar goedkeuring gaan) klikken.
- Een gebruiker die is ingelogd met de rol Operator kan op **'Release'** (Vrijgeven) klikken.

Opmerking: De algemene functionaliteit van de omgeving Approval wordt beschreven in de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual (Gebruikershandleiding van de Gamma-invoegtoepassing voor Rotor-Gene AssayManager v2.1).

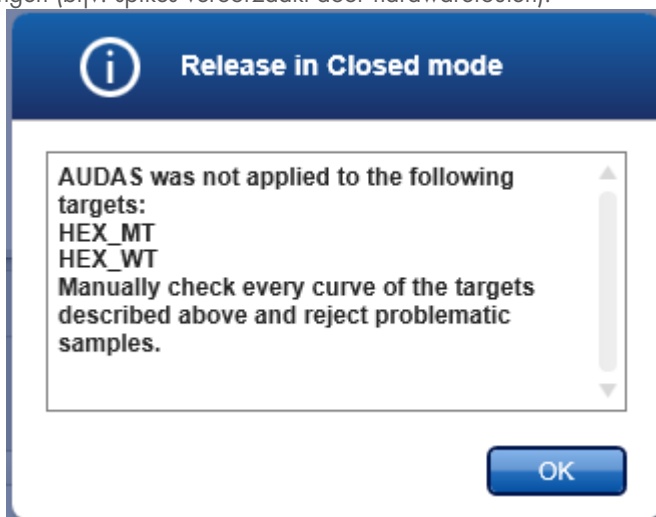
3. Geef de resultaten vrij.

- Als er op **'Release and go to approval'** (Vrijgeven en naar goedkeuring gaan) is geklikt, worden de resultaten van de proef weergegeven in de omgeving 'Approval' (Goedkeuring).
- Als er op **'Release'** (Vrijgeven) is geklikt, dient iemand met de rol 'Approver' (Goedkeurder) zich aan te melden en de omgeving 'Approval' (Goedkeuring) te selecteren.
 - Pas de filteropties toe (afbeelding 15, vak 19) om het experiment te selecteren dat moet worden goedgekeurd (afbeelding 15, vak 20). Klik vervolgens op **'Apply'** (Toepassen) (afbeelding 15, vak 21).



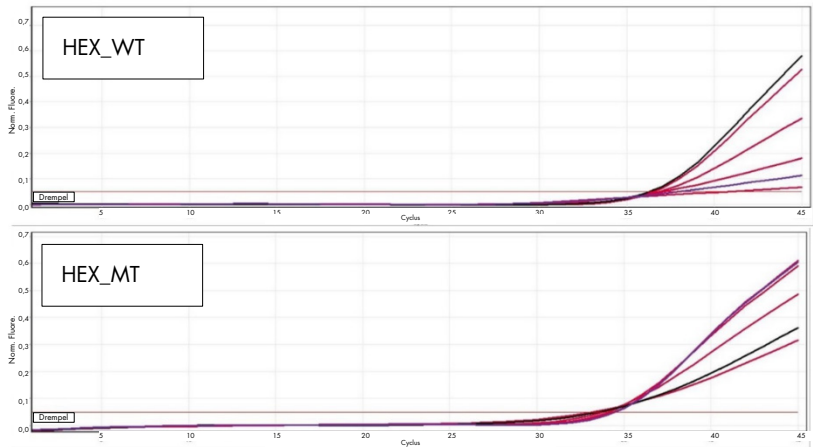
Afbeelding 15. Goedkeuring van run – Experiment selecteren. 19: Filteropties. 20: Assaysselectie. 21: Knop 'Start approval' (Goedkeuring starten).

- De volgende AUDAS-waarschuwing (automatische datascan) wordt weergegeven (afbeelding 16). In het gedeelte 'Plots and Information' (Plots en informatie) dient u de fluorescentiecurves van de HEX-targets handmatig te controleren op afwijkingen (bijv. spikes veroorzaakt door hardwarefouten).



Afbeelding 16. AUDAS-waarschuwing.

Opmerking: De curves van de HEX-targets van de interne controle hebben niet de typische sigmoïde vormen (zoals in de voorbeeldcurves in afbeelding 17 hieronder) en moeten worden beschouwd als valide curves. Alle andere interne controlevaliditeitscriteria (bijv., C_T-drempelwaarden) worden automatisch gecontroleerd door de software.






Afbeelding 17. HEX-curves voor interne controle.

De resultaten van de testmonsters zijn automatisch geanalyseerd door Rotor-Gene AssayManager v2.1, maar moeten worden goedgekeurd en vrijgegeven door de gebruiker die is aangemeld met de rol goedkeurder. Aanvankelijk hebben alle testmonsters van een beëindigd experiment de status 'Undefined' (Ongedefinieerd). Er staan bij monsterresultaten die moeten worden goedgekeurd drie goedkeuringsknoppen aan het einde van de betreffende rij. Met deze knoppen kunnen de monsterresultaten interactief worden geaccepteerd of afgekeurd (afbeelding 18 en afbeelding 19).

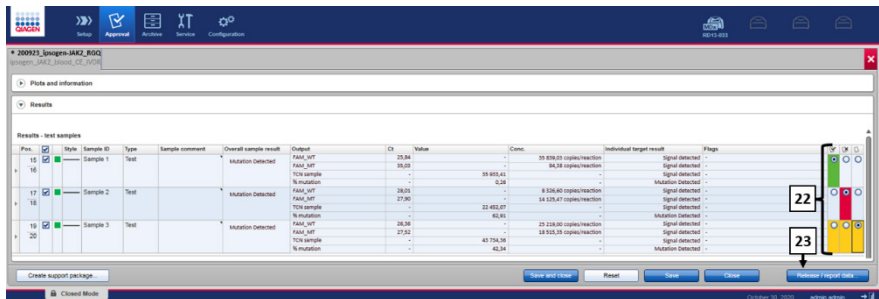
Opmerking: Een monster dat door Rotor-Gene AssayManager v2.1 als 'INVALID' (Ongeldig) wordt gerapporteerd kan niet opnieuw worden toegewezen als 'VALID' (Geldig), zelfs niet wanneer het monsterresultaat is geweigerd.

Opmerking: Een monster moet worden geweigerd als de gebruiker niet instemt met het resultaat en de test opnieuw wil uitvoeren (bijv. als er een afwijking is geconstateerd op de curves van de interne controle van de HEX-target).

- Controleer het resultaat (afbeelding 19, vak 22) en klik op 'Release/Report data' (Gegevens vrijgeven/rapporteren) (afbeelding 19, vak 23).

Achtergrondkleur	Status van test sample
	Ongedefinieerd
	Geaccepteerd
	Verworpen

Afbeelding 18. Definitie monstergoedkeuringsstatus.



Afbeelding 19. Gegevens vrijgeven en rapporteren. 22: Monstergoedkeuringsknoppen (resultaten voor elk monster goedkeuren (✓) of weigeren (✗)). 23: Knop Release and report data (Gegevens vrijgeven en rapporteren).

- Voer indien nodig het wachtwoord in, vink het vakje 'Create report' (Rapport aanmaken) aan en klik op 'OK' (afbeelding 20, vak 24 en 25). Het rapport wordt gegenereerd in pdf-indeling en wordt automatisch opgeslagen in de vooraf gedefinieerde map.

Het pad van de standaardmap is:

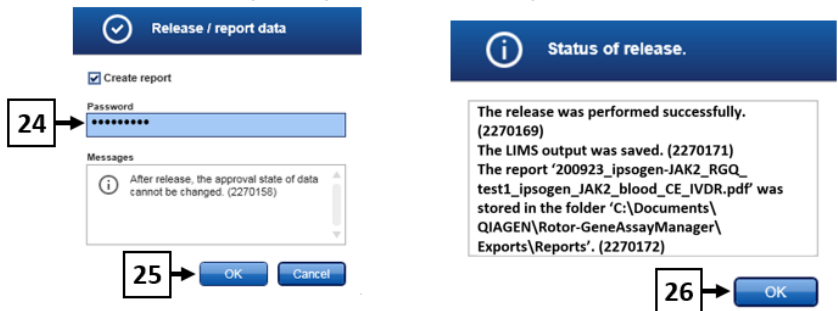
C: > Users > Public > Documents > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Opmerking: Dit pad en de map kunt u wijzigen in de omgeving 'Configuration' (Configuratie).

- Er wordt tegelijkertijd een LIMS-bestand automatisch aangemaakt en opgeslagen in de opgegeven map. Het pad van de standaardmap is: **C: > Users > Public > Documents > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > LIMS.**

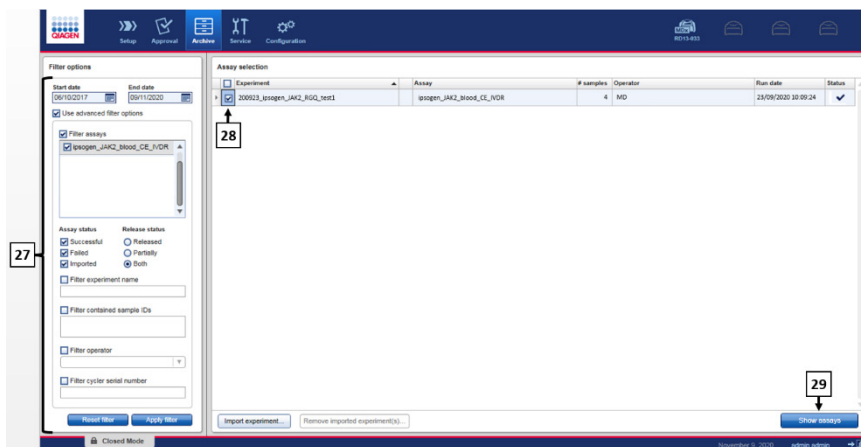
Opmerking: Dit pad en de map kunt u wijzigen in de omgeving 'Configuration' (Configuratie).

- Sluit het pdf-bestand en ga terug naar de Rotor-Gene AssayManager. Klik op 'OK' wanneer u hierom gevraagd wordt (afbeelding 20, vak 26).



Afbeelding 20. Gegevens vrijgeven en rapporteren. 24: Gebruikerswachtwoord. 25-26: Te selecteren OK-knop.

- Na het invoeren van het gebruikerswachtwoord, wordt er een pdf-rapport gegenereerd en geopend. Sluit het pdf-rapport. Er wordt vervolgens automatisch een LIMS-bestand gegenereerd en een vrijgaveverklaring weergegeven. Klik op 'OK'. De assay is nu volledig vrijgegeven. Klik op 'OK' om naar de omgeving 'Archive' (Archief) te gaan.
- Klik op het tabblad 'Archive' (Archief) om het .rex-bestand te exporteren dat overeenkomt met de onbewerkte gegevens. Zoek naar uw experiment met de filteropties (afbeelding 21, vak 27 en 28) en klik op 'Show assays' (Assays tonen) (afbeelding 21, vak 29).



Afbeelding 21. Omgeving Archive (Archief). 27: Filteropties. 28: Assayselectie. 29: Knop Show assays (Assays tonen).

- De resultaten van het experiment worden weergegeven. In de hoek rechtsonder van het scherm, selecteert u '**.rex-file**' (.rex-bestand) als het type bestand dat geëxporteerd moet worden. Klik op '**Export**' (Exporteren). Klik op '**OK**' om op te slaan. De software slaat het .rex-bestand automatisch op in de volgende vooraf opgegeven map: **C: > Users > Public > Documents > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments**.

Opmerking: Dit pad en de map kunt u wijzigen op het tabblad 'Specify the .rex file export destination' (Exportbestemming van het .rex-bestand opgeven).

Opmerking: Voor het oplossen van problemen is een ondersteuningspakket van de run vereist. U kunt een ondersteuningspakket genereren in de goedkeurings- of archiefomgeving (zie de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual*, hoofdstuk 'Troubleshooting', 'Creating a support package' [Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1, hoofdstuk 'Problemen oplossen', 'Een ondersteuningspakket maken']). Daarnaast kan de audittrail vanaf het moment van het voorval \pm 1 dag handig zijn. De audittrail kunt u downloaden in de serviceomgeving (zie de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* [Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1], hoofdstuk 1.5.5.5).

- Maak het Rotor-Gene Q MDx-instrument weer leeg en gooi de stripbuisjes weg conform de lokale veiligheidsvoorschriften.

Interpretatie van de resultaten

De analyse is volledig geautomatiseerd.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyseert eerst* amplificatiecurves en verklaart mogelijk niet-overeenstemmende curves ongeldig, afhankelijk van de vorm en ruisamplitude. Als dit het geval is, wordt de ongeldige curve gemarkeerd.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyseert vervolgens de controles van de run:

- NTC: De NTC wordt gecontroleerd op de afwezigheid van specifieke amplificatie (JAK2 WT en JAK2 MT).
- WT- en MT-QS: De validatie van de kwantificatiestandaarden is gebaseerd op de waarden van R^2 en de helling van elke standaardcurve.
- WTC: Het totaal aantal JAK2-kopieën (TCN) moet hoog genoeg zijn om deze controle te kunnen interpreteren. Als dit het geval is, wordt het JAK2-mutatiepercentage berekend. Deze runcontrole wordt gevalideerd als de status WT is volgens de test.
- MTC: Het totaal aantal JAK2-kopieën moet hoog genoeg zijn om deze controle te kunnen interpreteren. Als dit het geval is, wordt het JAK2-mutatiepercentage berekend. Deze runcontrole wordt gevalideerd als de status sterk positief is voor de JAK2-mutatie.

De interne controle (IC) moet worden geamplificeerd in alle putjes die controles en kwantificatiestandaarden bevatten, en moet binnen het vooraf opgegeven bereik voor controles liggen.

Opmerking: Het rapport dat aan het eind van elke run wordt gegenereerd, toont de resultaten die zijn verkregen met runcontroles. Voor ongeldige gegevens staan waarschuwingen die de ongeldigheid aanduiden (tabel 6).

* Alleen ingeschakeld voor FAM-targets.

Als een of meer runcontroles niet overeenstemmen, wordt de waarschuwing 'ASSAY_INVALID' gebruikt. Als deze waarschuwing wordt gemarkeerd, dient de run als ongeldig te worden beschouwd en moet het experiment worden herhaald.

Als alle controles in de run voldoen, analyseert de Rotor-Gene AssayManager v2.1 de testmonsters.

- De interne controle (IC) moet worden geamplificeerd in alle putjes die monsters bevatten, en moet binnen het vooraf opgegeven bereik liggen.
- Het totaal aantal kopieën moet hoog genoeg zijn in een bepaald monster om de resultaten te kunnen interpreteren.
- Vervolgens wordt het JAK2-mutatiepercentage berekend en wordt het resultaat weergegeven. Een CT-waarde moet worden waargenomen in elk buisje (WT en MT) voordat een monster wordt gevalideerd door Rotor-Gene AssayManager v2.1 en voordat het bijbehorende resultaat geldig kan zijn.

Opmerking: Als zowel de runcontroles als de monsterresultaten geldig zijn, wordt in het rapport voor elk monster het aantal kopieën en het mutatiepercentage weergegeven.

- In **tabel 6** vindt u de waarschuwingen voor ongeldige monsters die kunnen worden toegekend aan een afzonderlijk buisje tijdens de analyse door Rotor-Gene AssayManager v2.1. Bij elke waarschuwing staat een uitleg.
- In **tabel 7** (pagina 68) staat de waarschuwing voor monsters en een beschrijving van termen vermeld.

Tabel 6. Waarschuwingen voor ongeldige monsters met beschrijving van de termen

Waarschuwing	Beschrijving
ANALYSIS_FAILED	Assay is ingesteld als ongeldig, omdat de analyse is mislukt. Neem contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN.
ASSAY_INVALID	De assay is ongeldig omdat minstens één externe controle ongeldig is.
CONSECUTIVE_FAULT	Een doel dat voor de berekening voor dit doel is gebruikt, is ongeldig.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	De amplificatiecurve met onbewerkte gegevens heeft een vorm die afwijkt van het normale gedrag van deze assay. Er is een grote kans dat er sprake is van incorrecte resultaten of incorrecte interpretatie van resultaten.
FLAT_BUMP	De amplificatiecurve met onbewerkte gegevens heeft de vorm van een platte bobbel die afwijkt van het normale gedrag van deze assay. Er is een grote kans dat er sprake is van incorrecte resultaten of incorrecte interpretatie van resultaten (zoals een onjuist vastgestelde C_T -waarde).
INVALID_CALCULATION	De berekening voor dit doel is mislukt.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	De gedetecteerde C_T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de mutantcontrole met het wildtypereactiemengsel.
MC_IC_LOW_CT (WT)	De gedetecteerde C_T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de mutantcontrole met het wildtypereactiemengsel.
MC_IC_NO_CT (MT)	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de mutantcontrole met het mutantreactiemengsel.
MC_IC_NO_CT (WT)	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de mutantcontrole met het wildtypereactiemengsel.
MC_LOW_CN	Het aantal kopieën voor de mutantcontrole is te laag.
MC_LOW_PERCENTAGE	Het mutatiepercentage van de mutantcontrole is te laag.
MC_NO_CN	Er is geen aantal kopieën vastgesteld voor de mutantcontrole.
MC_NO_CT (MT)	Er is geen C_T detecteerbaar voor de mutantcontrole met het mutantreactiemengsel.

Tabel wordt vervolgd op de volgende pagina

Vervolgde tabel van de vorige pagina

Tabel 6. Waarschuwingen voor ongedige monsters met beschrijving van de termen (vervolg)

Waarschuwing	Beschrijving
MC_NO_VALUE	Het mutatiepercentage van de mutantcontrole heeft geen waarde.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	De gedetecteerde C_T is lager dan verwacht voor de mutantcontrole met het mutantreactiemengsel.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	De gedetecteerde C_T is lager dan verwacht voor de mutantcontrole met het wildtypereactiemengsel.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	De amplificatiecurve overschrijdt meer dan eens de drempelwaarde. Er kan geen duidelijke C_T worden vastgesteld.
NO_BASELINE	Er is geen basisniveau gevonden. Er kan geen verdere analyse worden uitgevoerd.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	De gedetecteerde C_T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het mutantreactiemengsel.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	De gedetecteerde C_T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het wildtypereactiemengsel.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het mutantreactiemengsel.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het wildtypereactiemengsel.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	De gedetecteerde C_T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het mutantreactiemengsel.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	De gedetecteerde C_T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het wildtypereactiemengsel.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	C_T gedetecteerd in de templateloze controle.
OTHER_TARGET_INVALID	Een ander doel voor hetzelfde monster is ongedig.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	De berekende concentratie voor dit monster overschrijdt de technische limiet.

Tabel wordt vervolgd op de volgende pagina

Vervolgde tabel van de vorige pagina

Tabel 6. Waarschuwingen voor ongeldige monsters met beschrijving van de termen (vervolg)

Waarschuwing	Beschrijving
QS_HIGH_SLOPE (MT)	De bovenlimiet van de mutanthelling wordt overschreden.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	De bovenlimiet van de wildtypehelling wordt overschreden.
QS_IC_NO_CT (MT)	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als een of meer van de mutantkwantificatiestandaarden.
QS_IC_NO_CT (WT)	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als een of meer van de wildtypekwantificatiestandaarden.
QS_LOW_SLOPE (MT)	Er wordt niet voldaan aan de onderlimiet voor de mutanthelling.
QS_LOW_SLOPE (WT)	Er wordt niet voldaan aan de onderlimiet voor de wildtypehelling.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	Er wordt niet voldaan aan de onderlimiet voor de mutant R^2 .
QS_LOW_RSQUARED (WT)	Er wordt niet voldaan aan de onderlimiet voor het wildtype R^2 .
QS_NO_CT (MT)	Er is geen detecteerbare C_T voor een of meer mutantkwantificatiestandaarden.
QS_NO_CT (WT)	Er is geen detecteerbare C_T voor een of meer wildtypekwantificatiestandaarden.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	De gedetecteerde C_T is lager dan verwacht voor een of meer van de mutantkwantificatiestandaarden.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	De gedetecteerde C_T is lager dan verwacht voor een of meer van de wildtypekwantificatiestandaarden.
RUN_FAILED	De assay is ingesteld als ongeldig vanwege een probleem met de cyclor of de aansluiting van de cyclor.
RUN_STOPPED	De assay is ingesteld als ongeldig, omdat de run handmatig is gestopt.
SAMPLE_LOW_CN	Het totaal aantal kopieën voor een testmonster is te laag.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	De gedetecteerde C_T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het mutantreactiemengsel.

Tabel wordt vervolgd op de volgende pagina

Vervolgde tabel van de vorige pagina

Tabel 6. Waarschuwingen voor ongeldige monsters met beschrijving van de termen (vervolg)

Waarschuwing	Beschrijving
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	De gedetecteerde C_T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het mutantreactiemengsel.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het mutantreactiemengsel.
SAMPLE_NO_CN	Er is geen aantal kopieën vastgesteld voor het testmonster.
SAMPLE_NO_VALUE	Het mutatiepercentage van een testmonster heeft geen waarde.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	De gedetecteerde C_T is lager dan verwacht voor een testmonster met het mutantreactiemengsel.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	De gedetecteerde C_T is lager dan verwacht voor een testmonster met het wildtypereactiemengsel.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	De gedetecteerde C_T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het wildtypereactiemengsel.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	De gedetecteerde C_T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het wildtypereactiemengsel.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het wildtypereactiemengsel.
SATURATION	De fluorescentie van onbewerkte gegevens raakt sterk verzadigd voor het buigpunt van de amplificatiecurve.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Er is in de amplificatiecurve een spike gedetecteerd dicht bij de C_T .
STEEP_BASELINE	Er is in de amplificatiecurve een snelle stijging in het basisniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van onbewerkte gegevens.
STRONG_BASELINE_DIP	Er is in de amplificatiecurve een sterke daling in het basisniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van onbewerkte gegevens.
STRONG_NOISE	Er is sterke ruis gedetecteerd buiten de groeifase van de amplificatiecurve.

Tabel wordt vervolgd op de volgende pagina

Vervolgde tabel van de vorige pagina

Tabel 6. Waarschuwingen voor ongeldige monsters met beschrijving van de termen (vervolg)

Waarschuwing	Beschrijving
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Er is sterke ruis gedetecteerd in de groeifase (exponentiële fase) van de amplificatiecurve.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Er is in de amplificatiecurve een golfing in het basisoniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van onbewerkte gegevens.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	Het mutatiepercentage van de wildtypecontrole is te hoog.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	De gedetecteerde C _T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de wildtypecontrole met het mutantreactiemengsel.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	De gedetecteerde C _T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de wildtypecontrole met het mutantreactiemengsel.
WTC_IC_NO_CT (MT)	Er is geen detecteerbare C _T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de wildtypecontrole met het mutantreactiemengsel.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Er is geen detecteerbare C _T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de wildtypecontrole met het wildtypereactiemengsel.
WTC_NO_CN	Er is geen aantal kopieën vastgesteld voor de wildtypecontrole.
WTC_NO_VALUE	Het mutatiepercentage van de wildtypecontrole heeft geen waarde.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	De gedetecteerde C _T is lager dan verwacht voor de wildtypecontrole met het mutantreactiemengsel.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	De gedetecteerde C _T is lager dan verwacht voor de wildtypecontrole met het wildtypereactiemengsel.

Tabel 7. Waarschuwingen voor monsters met beschrijving van de termen

Waarschuwing	Beschrijving
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Het percentage fluorescentiewijziging van dit monster ten opzichte van het monsterbuisje met de grootste fluorescentiewijziging is kleiner dan een opgegeven limiet.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	De reactie-efficiëntie voor dit monster heeft een opgegeven limiet niet bereikt.
SPIKE	Er is in de fluorescentie van de onbewerkte gegevens een spike gedetecteerd in de amplificatiecurve, maar buiten het gebied waar de C_T wordt bepaald.

Beperkingen

De kit is bestemd voor professioneel gebruik.

Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door professionals die speciaal zijn opgeleid en getraind in het gebruik van moleculaire biologische technieken en bekend zijn met de technologie van het hulpmiddel. De hulpmiddelprocedure moet in een moleculair-biologische laboratoriumomgeving worden geïmplementeerd.

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is geen geautomatiseerd hulpmiddel. De analyse wordt echter ondersteund door software die speciaal voor automatische mutatiekwantificering is bestemd.

De kit moet conform de instructies in deze handleiding worden gebruikt, in combinatie met een gevalideerd instrument dat in 'Benodigde, maar niet-meegeleverde materialen' op pagina 20 staat vermeld.

Let goed op de vervaldatum op het etiket van de doos en de etiketten op de buisjes. Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken.

Alle reagentia in de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit zijn uitsluitend bestemd voor gebruik met de andere reagentia in dezelfde kit. Het niet opvolgen van deze richtlijn kan invloed hebben op de prestaties.

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is uitsluitend gevalideerd voor humaan perifeer volbloed ontsteld met 2K-EDTA dat is afgenomen bij patiënten bij wie MPN wordt vermoed of is vastgesteld.

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is uitsluitend gevalideerd voor gebruik in combinatie met de QIA Symphony DSP DNA Mini Kit (cat.nr. 937236) of de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (cat.nr. 61104).

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is uitsluitend gevalideerd voor gebruik met de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (voor PCR) en de QIASymphony SP (voor monsterbereiding).

Bij afwijkend gebruik van dit product en/of aanpassing van de componenten vervalt de aansprakelijkheid van QIAGEN.

Gegenereerde diagnostische resultaten moeten in combinatie met overige klinisch-pathologische bevindingen worden geïnterpreteerd. De afwezigheid van JAK2 V617F/G1849T-mutatie sluit de aanwezigheid van andere JAK2-mutaties niet uit. Als er extra mutaties voorkomen in de nucleotiden 88504 tot 88622, kunnen de testresultaten fout-negatief zijn (16).

Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden gebruikt en niet worden gedekt door de prestatieonderzoeken van QIAGEN.

Prestatiekenmerken

Analytische prestaties

Blancolimiet

De blancolimiet (Limit of Blank, LoB) is vastgesteld conform de CLSI/NCCLS EP17-A2-norm, via 30 gezonde, gedoneerde volbloedmonsters, met een wildtype (WT)-JAK2-status, met behulp van drie reagenspartijen (120 metingen/partij).

De LoB-resultaten zijn samengevat in **tabel 8**. Dit komt overeen met de verwachte waarde in een normale populatie met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Tabel 8. Overzicht van de LoB-resultaten

	Gemeten LoB	Uiteindelijke blancolimiet
Partij 1	0%	
Partij 2	0%	0%
Partij 3	0%	

Detectielimiet

De detectielimiet (LoD of analytische gevoeligheid) is vastgesteld conform de 'Probit approach' (Probit-aanpak) die wordt beschreven in de norm CLSI/NCCLS EP17-A2. In dit onderzoek zijn 6 lage niveaus van mutatie geanalyseerd voor 3 onafhankelijke monsters (MPN-volbloed-DNA gespiket in wildtype (WT)-volbloed-DNA), met 3 partijen, 60 metingen per monster en per mutatie. De verkregen resultaten gaven aan dat de analytische gevoeligheid 0,042% was van de JAK2 V617F-mutatie.

De LoD-resultaten zijn samengevat in tabel 9.

Tabel 9. Overzicht van de LoD-resultaten

	Gemeten LoD	Uiteindelijke detectielimiet
Partij 1	0,041%	
Partij 2	0,029%	0,042%
Partij 3	0,042%	

Kwantificatielimiet

De definitie en bepaling van de kwantificatielimiet (LoQ) is gebaseerd op de richtlijn CLSI/NCCLS EP17-A2. LoQ is gedefinieerd als het laagste JAK2 V617F-mutatiepercentageniveau dat nauwkeurig onderscheiden kan worden van de LoD van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, met een betrouwbaarheidsinterval van 95% (risico op fouten $\alpha = 0,05$). Gegevens van het herhaalbaarheidsonderzoek, afkomstig van één locatie, werden gebruikt om de LoQ van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit te berekenen. De verkregen resultaten geven aan dat de LoQ 0,233% van de JAK2 V617F-mutatie was.

In de context van het monitoren van moleculaire aandoeningen, impliceert dit dat, als het gemeten JAK2 V617F-mutatiepercentage op gegeven moment onder 0,233% daalt, een draagvlakreductie van het JAK2 V617F-allel in het vervolg niet betrouwbaar gekwantificeerd kan worden.

Lineariteit

De lineariteit van de kwantificering van de JAK2-mutatie bij MPN-patiënten is beoordeeld conform de norm CLSI/NCCLS EP06AE, met één partij van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en met testen op 11 niveaus van mutatie voor vijf verschillende DNA-monsters. De kwantificering van het JAK2-mutatiedraagvlak in MPN-monsters is lineair. Dat betekent dat de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit monsters kan kwantificeren vanaf de LoD-waarde tot 100% mutatie, wat overeenkomt met de verwachte waarden in de getroffen populatie, mits de gekwantificeerde DNA-monsterconcentratie dicht bij 10 ng/ μ l ligt (tussen 5 en 20 ng/ μ l).

Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

De opzet van het nauwkeurigheidsonderzoek op één afzonderlijke locatie voldoet aan de vereisten van de CLSI/NCCLS EP5-A3-norm. De tests zijn uitgevoerd op 11 mutatieniveaus, van 0,07% tot 72,67%, met behulp van verschillende verdunningen van klinisch monster van een MPN-patiënt. Voor elk mutatieniveau werden 108 metingen verkregen door drie operators gedurende 27 dagen (twee replicaten per run en twee runs per dag) met drie partijen *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en drie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenten. De nauwkeurigheid voor het 100%-niveau is uitgedrukt in vergelijking met de nauwkeurigheid voor het 72,67%-niveau, gebaseerd op trendanalyses die worden ondersteund door aanvullende gegevens die zijn verkregen met een 100% JAK2 V617F-monster bestaande uit DNA van de MUTZ-8-cel lijn (38 metingen).

De resultaten zijn samengevat in tabel 10.

Tabel 10. Resultaten van nauwkeurigheid: herhaalbaarheid (onderzoek op één afzonderlijke locatie)

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

SD: Standaarddeviatie

H+: Reproduceerbaarheid

RUN++: Nauwkeurigheid tussen runs

TOTAAL+++: Totale nauwkeurigheid (inclusief tussen instrumenten, tussen gebruikers en tussen partijen)

VC_{TOTAAL}: Variatiecoëfficiënt voor de totale precisie in percentages

ND: Niet bepaald.

De opzet van het nauwkeurigheidsonderzoek tussen laboratoria voldoet aan de vereisten van de CLSI/NCCLS EP5-A3-norm. Het onderzoek werd uitgevoerd op vier locaties (Frankrijk, Duitsland en twee locaties in de VS). De tests zijn uitgevoerd op zeven mutatieniveaus, van 1,21% tot 67,64%, met verdunningen van de MUTZ-8-celijn in gezond gedoneerd volbloed (d.w.z. kunstmatige monsters). Elke locatie heeft drie DNA-extractieruns uitgevoerd met het QIA Symphony SP-instrument en een unieke batch van de QIA Symphony DSP DNA Mini Kit. Elk DNA-extract is in acht qPCR-runs getest (twee runs per dag en per locatie gedurende vier niet-openvolgende dagen) met behulp van een unieke batch *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, wat tot 96 verwachte metingen per monster voor alle locaties samen heeft geleid.

Het L2-monster was ongeldig in één extractierun wat tot een totaal aantal van 88 qPCR-tests heeft geleid in plaats van 96. Eén van de qPCR-runs was bovendien ongeldig, wat heeft geresulteerd in drie ongeldige tests voor alle monsters (behalve L2, d.w.z. 2 ongeldige resultaten). Het L7-monster was bovendien ongeldig in één qPCR-run en L4 was ongeldig bij twee qPCR-runs, wat heeft geleid tot nogmaals twee ongeldige tests (tabel 11).

De nauwkeurigheid voor het 100%-niveau is uitgedrukt in vergelijking met de nauwkeurigheid voor het 67,64%-niveau, gebaseerd op trendanalyses die worden ondersteund door aanvullende gegevens die zijn verkregen met een 100% JAK2 V617F-monster bestaande uit DNA van de MUTZ-8-celijn (38 metingen).

Tabel 11. Resultaten van nauwkeurigheid: herhaalbaarheid (onderzoek tussen laboratoria)

Monster	Totaalaantal tests	Totaalaantal ongeldige tests	Gemiddelde JAK2%MT	SD, %CV binnen een run	SD, %CV tussen runs binnen een dag	SD, %CV binnen een dag	SD, %CV tussen locaties	Totale SD, %CV
L0	N.v.t.	N.v.t.	100	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	≤ 4,074, ≤ 6,02
L1	96	3	67,64	2,616, 3,87	2,060; 3,05	1,999; 2,96	1,530; 2,26	4,074; 6,02
L2	88	2	40,03	3,482, 8,70	1,011; 2,53	2,389; 5,97	0,986; 2,46	4,387; 10,96
L3	96	3	22,26	3,318, 14,90	1,256; 5,64	1,257; 5,64	0,803; 3,61	3,807; 17,10
L4	96	5	8,02	1,770, 22,06	0,516; 6,44	0,000; 0,00	0,000; 0,00	1,841; 22,95
L5	96	3	4,35	0,706, 6,23	0,547; 12,57	0,000; 0,00	0,197; 4,53	0,906; 20,82
L6	96	3	2,03	0,246, 12,15	0,365; 18,00	0,063; 3,11	0,000; 0,00	0,441; 21,76
L7	96	4	1,21	0,104, 8,62	0,057; 4,72	0,211; 17,43	0,000; 0,00	0,189; 15,64

JAK2%MT: JAK2-mutatiepercentage; **SD:** Standaardafwijking; **CV:** Variatiecoëfficiënt in percentages; **N.v.t.:** Niet van toepassing

Er is een extra onderzoek tussen laboratoria uitgevoerd tussen de drie testlocaties (één in Europa en twee in de VS) op vier volbloedmonsters van MPN-patiënten (d.w.z. klinische monsters). Elke locatie heeft drie DNA-extractieruns uitgevoerd. Elk DNA-extract is getest in 12 qPCR-runs (één replicaat per run per monster, twee runs per dag per operator op elke locatie [er waren twee operators per locatie bij betrokken] gedurende drie niet-opeenvolgende dagen) op één Rotor-Gene Q MDx-instrument met één partij *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Voor elk monster werden 36 metingen verkregen (tabel 12).

Tabel 12. Aanvullende resultaten van onderzoeken tussen laboratoria

Monster	N	Gemiddelde JAK2%MT	SD, %CV binnen een run	SD, %CV tussen runs binnen een dag	SD, %CV binnen een dag	SD, %CV tussen locaties	Totale SD, %CV
Monster 1	36	95,19	0,995, 1,04	0,000; 0,00	0,541; 0,57	0,000; 0,00	1,130, 1,19,
Monster 2	36	22,83	3,988, 17,47	0,000; 0,00	1,707; 7,48	1,552; 6,80	4,501; 19,72
Monster 3	36	14,44	2,257, 15,63	1,398; 9,68	0,000; 0,00	1,422; 9,84	2,890; 20,01
Monster 4	36	4,03	0,186, 4,63	0,835; 20,74	0,000; 0,00	0,608; 15,09	0,922; 22,91

JAK2%MT: JAK2-mutatiepercentage; **N:** Aantal metingen; **SD:** Standaardafwijking; **CV:** Variatiecoëfficiënt in percentages

Interfererende stoffen (analytische specificiteit)

De opzet van voldoet aan de vereisten van de NCCLS-norm EP7-A3 'Interference Testing in clinical Chemistry' (Interferentietesten in klinische chemie). In totaal werden 19 stoffen die potentieel aanwezig zijn in bloedmonsters uitgekozen vanwege hun potentiële effect op de PCR (busulfan, citalopram-hydrobromide, paroxetine-hydrochloridehemihydraat, sertraline-hydrochloride, fluoxetine-hydrochloride, acetaminophen [paracetamol], ongeconjugeerde bilirubine, kalium 2K-EDTA en 3K-EDTA, natrium-EDTA, hemoglobine [humaan], triglyceride, lisinopril-dehydraat, hydroxyurea, acetylsalicylzuur, salicylzuur, thiotepa, anagrelide, interferon alfa-2b).

Stoffen uit het DNA-extractieproces werden tevens geëvalueerd (QSL1, QSB1, QSW1, QSW2 en PK van de QIA Symphony DSP DNA Blood Mini Kit; QIAGEN Protease, ethanol, AW1 en AW2 uit de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit).

De verkregen resultaten duiden niet op een versturende werking van deze stoffen.

Tabel 13. Interfererende stoffen

Geteste stof	Geteste concentratie
Bilirubine ongeconjugerd	150,3 µg/mL
Hemoglobine [humaan]	2000 µg/mL
Triglyceriden	30000 µg/mL
Busulfan	38,4 µg/mL
Citalopram hydrobromide	0,75 µg/mL
Paroxetine hydrochloride-hemihydraat	1,14 µg/mL
Sertraline hydrochloride	0,67 µg/mL
Fluoxetine hydrochloride	3,87 µg/mL
Acetaminophen [paracetamol]	200,7 µg/mL
Lisinopril dehydraat	0,33 µg/mL
Hydroxyurea	28,2 µg/mL
Acetylsalicylzuur	651,6 µg/mL
Salicylzuur	0,6 µg/mL
Thiotepa	48 µg/mL
Anagrelide	6 µg/mL
Interferon alfa 2b*	1,8 MU/L
Kalium-EDTA (2K-EDTA)	2x (3600 µg/mL)
Kalium-EDTA (3K-EDTA) †	1x (1800 µg/mL), 3x (5400 µg/mL)

Tabel wordt vervolgd op de volgende pagina

Vervolgde tabel van de vorige pagina

Tabel 13. Interfererende stoffen (vervolg)

Geteste stof	Geteste concentratie
Natrium-EDTA (2Na-EDTA) †	1x (3000 µg/ml), 3x (9000 µg/ml)
QSL1	2% van totale monstervolume
QSB1	2% van totale monstervolume
QSW1	2% van totale monstervolume
QSW2	2% van totale monstervolume
proteïnase K (PK) ‡	2% van totale monstervolume
proteïnase K (PK) ‡	2x het verwachte restvolume na het extractieproces 3x het verwachte restvolume na het extractieproces
QIAGEN Protease	1,29E-05 % van totale monstervolume
Ethanol (EtOH)	1,29E-03 % van totale monstervolume
Buffer AW1	1,00 E-01 % van totale monstervolume
Buffer AW2	1,00% van totale monstervolume

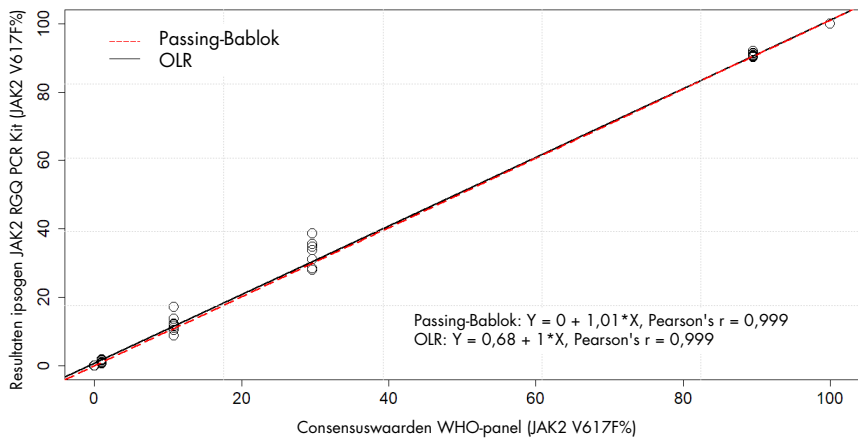
* De aanbevolen dosis voor PV-patiënten is 3 MU, waarbij ervan wordt uitgegaan dat deze is verdeeld over 5 L bloed (80 Kg individueel), wat leidt tot een concentratie van 0,6 MU/L. Bij het volgen van de aanbevelingen van de NCCLS-norm EP7-A2, werd driemaal deze concentratie getest, d.w.z. 1,8 MU/L.

† 1x concentratie volgens leverancier

‡ PK veroorzaakt een interfererend effect wanneer het wordt getest op 2% van het totale monstervolume (onwaarschijnlijk); verdere tests hebben uitgewezen dat PK wordt verwijderd tijdens het extractieproces: geen storende werking wordt verwacht onder normale gebruiksomstandigheden.

Tests van de WHO International Reference Panel for Genomic JAK2 V617F (NIBSC, panelcode 16/120)

De WHO 1st International Reference Panel for Genomic JAK2 V617F, ontwikkeld door het National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, panelcode 16/120) is getest aan de hand van drie partijen van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (drie replicaten per niveau van de referentiepanel en per reagenslot). De experimenten zijn over een periode van drie dagen uitgevoerd door één operator met één Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument. De overeenstemming tussen de resultaten uit de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en de consensuswaarden die zijn gepubliceerd in de gebruiksaanwijzing van de Reference Panel zijn geëvalueerd met behulp van een normale lineaire regressie (helling: 1,003, 95%BI [0,997; 1,010] – asafsnede: 0,677, 95%BI [0,212; 1,289]) en een Passing-Bablok-regressie (helling: 1,01, 95%BI [1,00; 1,021] – asafsnede: 0,00, 95%BI [-0,02; 0,010]) (afbeelding 22). De overeenstemming is bevestigd en toont de geschiktheid van de kit aan in het verstrekken van JAK2 V617F-gegevens die overeenstemmen met andere veelgebruikte diagnostische technieken.



Afbeelding 22. Overeenstemming tussen de resultaten van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en de consensuswaarden van de WHO International Reference Panel for Genomic JAK2 V617F (NIBSC, panelcode 16/120). De overeenstemming is geëvalueerd met een normale lineaire regressie (OLR) en een Passing-Bablok-regressie. De panel is opgebouwd uit zeven JAK2 V617F-niveaus: 100%, 89,5%, 29,6%, 10,8%, 1,00%, 0,03% en 0%. De WHO-consensuswaarden zijn vastgesteld aan de hand van een reeks veelgebruikte technieken als onderdeel van een internationaal samenwerkingsonderzoek; de referentiewaarden die aan elk JAK2 V617F%-niveau zijn toegekend, zijn mediaanwaarden (meer informatie op <https://www.nibsc.org>).

Waarheidsgetrouwheid en nauwkeurigheid

De waarheidsgetrouwheid van een meting is omgekeerd evenredig aan de systematische meetfout (SE of vertekening). De vertekening is berekend op basis van instructies van de NCCLS-richtlijn EP09c, voor elk JAK2 V617F%-niveau van de referentiepanel, voor elke reagenspartij en voor alle reagenspartijen (tabel 14), waarbij gebruik werd gemaakt van gegevens uit het hierboven vermelde onderzoek. De hoogste vertekeningwaarden zijn verkregen met partij 2 van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

De nauwkeurigheid is de overeenstemmingsgetrouwheid tussen een testresultaat en de aanvaarde referentiewaarde (in dit geval: de toegewezen waarde aan elk JAK2 V617F%-niveau van de WHO-panel). Voor de nauwkeurigheid wordt zowel rekening gehouden met waarheidsgetrouwheid als precisie, en deze is omgekeerd proportioneel aan de totale fout, die wordt berekend zoals aangegeven in tabel 14.

Tabel 14. Vertekening en meetfout

WHO-panel Ampoule code referentiewaarde	Partij uit de ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit	Vertekening (SE) per partij [95%BI]	Vertekening (SE) algemeen [95%BI]	Totale fout (nauwkeurigheid)
15/172 0%	1	0,000 [n.v.t.]	0,001 [-0,001; 0,004]	0,010
	2	0,003 [-0,011; 0,018]		
	3	0,000 [n.v.t.]		
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]		

Tabel wordt vervolgd op de volgende pagina

Vervolgde tabel van de vorige pagina

Tabel 14. Vertekening en meetfout (vervolg)

WHO-panel Ampoule code Referentiewaarde	Partij uit de ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit	Vertekening (SE) per partij [95%BI]	Vertekening (SE) algemeen [95%BI]	Totale fout (nauwkeurigheid)
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.v.t.]		
	3	-0,013 [-0,028; 0,001]		

SE: Systematische fout of vertekening, d.w.z. het verschil tussen het gemiddelde van de individuele metingen verkregen met de ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit ($\bar{V}_{\text{JAK2 Kit}}$) en de consensuswaarde van de WHO Reference Panel (V_{Ref}).

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

De totale fout (TE) wordt berekend als $TE = \sqrt{s^2 + SE^2}$, waarbij s de standaardafwijking (willekeurige fout) is.

95% BI: 95% betrouwbaarheidsinterval

N.v.t.: niet van toepassing.

Analytische nauwkeurigheid

Het doel van dit onderzoek was om de analytische nauwkeurigheid van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit te valideren onder normale gebruiksomstandigheden met klinische monsters van proefpersonen bij wie myeloproliferatieve neoplasmata werden vermoed. Dit onderzoek is uitgevoerd op gDNA-monsters die geëxtraheerd zijn van in totaal 473 specimens: 276 met vermoede PV, 98 met ET en 99 met PMF. De JAK2 V617F-status van de patiëntmonsters die zijn verkregen met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is vergeleken met de JAK2 V617F-status die is verkregen aan de hand van de referentiemethode voor de vaststelling van de JAK2-status, d.w.z. een onafhankelijke, gevalideerde, bi-directionele sequencing (BDS). Aangezien de LoD van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit 0,042% van JAK2 V617F is, is de JAK2 V617F-status van een patiëntmonster dat getest is met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit boven of op deze limiet positief en is de status onder deze limiet negatief. Van de 473 specimens waren er 22 JAK2-positief met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit terwijl ze negatief waren met BDS.

De algehele overeenstemming is 95,35% (451/473 proefpersonen; 95% BI: 93,04%, 97,06%). De positieve overeenstemming was 100% (165/165 proefpersonen; 95% BI: 97,79%, 100%) en de negatieve overeenstemming was 92,86 % (286/308 proefpersonen; 95% BI: 89,39%; 95,47%). De resultaten worden weergegeven in tabel 15.

Tabel 15. Overeenstemming tussen de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en bi-directionele Sanger-sequencing in MPN-populatie (gecombineerde populaties van ET, PMF en PV)

		Bi-directionele Sanger-sequencing		
		JAK2 V617F-positief	JAK2 V617F-negatief	Totaal
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	JAK2 V617F-positief	165	22	187
	JAK2 V617F-negatief	0	286	286
	Totaal	165	308	473

Evaluatie van resultaten van analytisch nauwkeurigheidsonderzoek in MPN-cohorten

De overeenstemming tussen resultaten verkregen voor de JAK2 V617F-mutatie met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en met Sanger-sequencing (BDS) in proefpersonen met ET, PMF en PV worden afzonderlijk vermeld:

- Voor ET is de algehele overeenstemming 89,8% (88/98 proefpersonen; 95% BI: 82,03–95,0%), is de positieve overeenstemming 100% (43/43 proefpersonen; 95% BI: 91,78–100%) en is de negatieve overeenstemming 81,82 % (45/55 proefpersonen; 95% BI: 69,1–90,92%).
- Voor PMF is de algehele overeenstemming 93,94% (93/99 proefpersonen; 95% BI: 87,27–97,74%), is de positieve overeenstemming 100% (51/51 proefpersonen; 95% BI: 93,02–100%) en is de negatieve overeenstemming 87,5 % (42/48 proefpersonen; 95% BI: 74,75–95,27%).
- Voor PV is de algehele overeenstemming 97,83% (270/276 proefpersonen; 95% BI: 95,33–99,2%), is de positieve overeenstemming 100% (71/71 proefpersonen; 95% BI: 94,94–100%) en is de negatieve overeenstemming 97,07 % (199/205 proefpersonen; 95% BI: 93,74–98,92%).

De specimens die strijdige resultaten opleverden, leken mutatieniveaus onder de BDS-detectiecapaciteit te hebben (ongeveer 10%). Omdat Sanger-sequencing niet zo gevoelig is als de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, die waarden van zelfs slechts 0,042% van JAK2 V617F (d.w.z. de LoD-waarde) kan detecteren, is er een afzonderlijk onderzoek uitgevoerd met een gevalideerde NGS-methode (Next Generation Sequencing) om het JAK2 V617F-allel te detecteren in de 15/22 strijdige monsters (negen ET, vijf PMF en één PV), evenals een willekeurig geselecteerde set van 22 JAK2 V617F-positieve en -negatieve overeenstemmende specimens. De JAK2 V617F-status van patiëntmonsters werd vastgesteld aan de hand van de NGS-methode op basis van diens limiet voor analytische gevoeligheid (d.w.z. tussen 1% en 2% van JAK2 V617F). Daarom was de JAK2 V617F-status van een patiëntmonster positief als de JAK2 V617F-mutatie werd gedetecteerd door middel van de NGS-methode en was de JAK2 V617F-status bijgevolg negatief als de JAK2 V617F-mutatie niet werd gedetecteerd.

Alle 15 strijdige specimens hadden een positieve testuitslag bij NGS, wat overeenstemt met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Alle overeenstemmende monsters hadden dezelfde testuitslag met NGS, wat eveneens overeenstemt met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en BDS. De 7 overige monsters werden als strijdig beschouwd, omdat er geen NGS-gegevens beschikbaar waren voor deze monsters.

Conclusie van het analytisch nauwkeurigheidsonderzoek

Na herclassificering van de strijdige gevallen bij gebruik van de NGS-resultaten toonde de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit een nauwkeurigheid van 98,3% aan voor de detectie van het JAK2 V617F-allel in specimens van MPN-proefpersonen met JAK2 V617F-niveaus van $\geq 0,042\%$ (d.w.z. de LoD-waarde).

Klinische prestaties

De klinische prestaties van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit voor de diagnose van PV werd geëvalueerd tijdens een multicenter, internationaal, prospectief interventieonderzoek.

Het doel van het onderzoek was om de nauwkeurigheid van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit aan te tonen voor de detectie van de V617F-mutatie in proefpersonen met vermoede PV. De referentie voor het vaststellen van de JAK2-status was een onafhankelijk gevalideerde bi-directionele sequencing-methode (BDS).

De detectie van de JAK2 V617F-mutatie is in eerste instantie geïntroduceerd door de referentiecriteriën die de WHO in 2008 heeft gesteld voor de diagnose van BCR-ABL-negatieve MPN en de aanwezigheid van deze mutatie is een belangrijk criterium voor bevestiging van de diagnose (17).

De aanwezigheid van JAK2 V617F is een van de twee belangrijke diagnostische criteria (dat PV wordt bevestigd als twee belangrijke criteria en één minder belangrijk criterium aanwezig zijn of het eerste belangrijke criterium en twee minder belangrijke criteria aanwezig zijn, in overeenstemming met WHO 2008*; zie referentie 17 voor meer informatie).

Het doel was om de specificiteit, gevoeligheid, positieve voorspellende waarde (Positive Predictive Value, PPV), negatieve voorspellende waarde (Negative Predictive Value, NPV) en waarschijnlijkheidsverhouding voor diagnoses te evalueren zoals opgesteld door de 2008 WHO-diagnosecriteria* met behulp van het vaststellen van de JAK2 V617F-status door gebruik te maken van ofwel de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit met een grenswaarde 0,042% voor positiviteit (d.w.z. de LoD van de kit) of van BDS.

Het onderzoek werd uitgevoerd op negen onderzoekslocaties in de VS (zeven deelnemende proefpersonen), 12 onderzoekslocaties in Frankrijk (alle 12 deelnemende proefpersonen) en negen onderzoekslocaties in Italië (vijf deelnemende proefpersonen). Proefpersonen werden gescreend en geselecteerd op basis van inclusiecriteria die een diagnose van PV aantoonde. Alle deelnemende proefpersonen ondergingen bloedonderzoeken met zowel de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en de referentietest, vaststelling van de status van JAK2 V617F als JAK2 exon 12 via bidirectionele sequencing (BDS). Proefpersonen met klinische eigenschappen die compatibel zijn met de diagnose van PV (met inbegrip van toegenomen hemoglobine- en afgenomen erytropoëtiëgehalten [EPO]), maar met negatieve vaststelling van JAK2 V617F en exon 12 via BDS, en proefpersonen met een positieve vaststelling van JAK2 V617F en exon 12 via BDS en normale of hoge EPO-gehalten, moesten een beenmergbiopsie met histologische en cytogenetische analyse ondergaan, zoals vereist door het 2008 WHO-diagnosealgoritme voor myeloproliferatieve aandoeningen. De uiteindelijke diagnose (zowel PV als niet-PV) werd vastgesteld op basis van de resultaten van de procedures die geen deel uitmaakten van het onderzoek (d.w.z. de 2008 WHO-criteria met bepaling van de JAK2-mutatie middels de BDS-referentieassay).

De evalueerbare populatie omvatte in totaal 216 proefpersonen die zowel aan de klinische screeningcriteria als de analytische criteria voldeden op basis van de BDS-referentieassay. Daarnaast waren 67 proefpersonen niet evalueerbaar vanwege de redenen die in tabel 16 staan vermeld (sommige proefpersonen waren om meer dan één reden niet evalueerbaar).

* Aangezien het onderzoek naar de klinische prestaties werd gestart voordat de WHO-diagnosecriteria in 2016 werden bijgesteld, werden de WHO-diagnosecriteria uit 2008 gebruikt om het onderzoek naar de klinische prestaties uit te voeren.

Tabel 16. Reden voor uitsluiting van de deelnemende populatie

Reden	Aantal proefpersonen
Voldoen niet vanwege de inclusie- of exclusiecriteria	9
EPO-resultaten ontbreken	22
BM-biopsie ontbreekt, indien vereist voor PV-diagnose	26
JAK2 V617F-positief volgens BDS en serum-EPO binnen de normale limieten	15
JAK2 exon 12-positief volgens BDS en serum-EPO binnen de normale limieten	1
JAK2 V617F-negatief volgens BDS en abnormaal lage serum-EPO	10
Patiënten hebben het onderzoek niet afgerond en/of de uiteindelijke diagnose van PV ontbreekt	15

Voor dit onderzoek zijn in totaal 221 JAK2 V617F-status evaluaties (inclusief vijf herhalingstesten) uitgevoerd met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit op het Rotor-Gene Q MDx-instrument (tabel 17, tabel 18).

Tabel 17. Samenvatting van *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-testresultaten (evalueerbare populatie)

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Totaal (N=216)
JAK2 V617F-positief (\geq LoD d.w.z. 0,042%)	54
JAK2 V617F-negatief ($<$ LoD d.w.z. 0,042%)	162

Tabel 18. Samenvatting van *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-testresultaten – JAK2 V617F-positieve populatie (van de evalueerbare populatie)

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Totaal (N=54)
gemiddelde verkregen JAK2 %MT-waarde	51,54
minimaal verkregen JAK2 %MT-waarde	0,14
maximaal verkregen JAK2 %MT-waarde	93,43

N: aantal monsters; **JAK2 %MT**: JAK2-mutatiepercentage

Evaluatie van validatie onderzoeksresultaten: prestatieresultaat

De vergelijking van de uiteindelijke PV- en niet-PV-diagnoses heeft uitgewezen dat de twee diagnosemethoden overeenstemden: Bij 94,6% van de proefpersonen (53/56 proefpersonen) bij wie PV werd geconstateerd door de onderzoeker, werd ook PV geconstateerd met behulp van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en de WHO-diagnosecriteria. Vergelijkbaar werd 95,6% van de proefpersonen (153/160 proefpersonen) die als niet-PV werden gediagnosticeerd door de onderzoeker, ook als niet-PV gediagnosticeerd met behulp van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en de WHO-diagnosecriteria (tabel 19, tabel 20).

De mutatiestatussen van JAK2 V617F en exon 12 via BDS, en JAK2 V617F via de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit zijn samengevat in tabel 19. In tabel 19 staat een vergelijking van PV- en niet-PV-diagnoses vermeld die met behulp van elke testmethode zijn vastgesteld.

Tabel 19. Mutatiestatus (JAK2 V617F via bi-directionele sequencing, JAK2 exon 12 via bi-directionele sequencing en ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit) per PV-status (evalueerbare populatie)

Variabel	PV (N=56)	Niet-PV (N=160)	Totaal (N=216)
JAK2 V617F-mutatiestatus via BDS			
Positief	48 (85,7%)	1 (0,6%)	49 (22,7%)
Negatief	8 (14,3%)	159 (99,4%)	167 (77,3%)
JAK2 exon 12-mutatiestatus via BDS			
Positief	3 (5,4%)	0	3 (1,4%)
Negatief	53 (94,6%)	160 (100,0%)	213 (98,6%)
Status via ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit			
Positief	48 (85,7%)	6 (3,8%)	54 (25%)
Negatief	8 (14,3%)	154 (96,3%)	162 (75%)

N: Aantal patiënten gediagnosticeerd door de onderzoeker (geëvalueerde populatie).

Voor elke mutatiestatus wordt het aantal patiënten als een absolute waarde uitgedrukt en als percentage van de geëvalueerde populatie (tussen haakjes).

Tabel 20. Uiteindelijke PV-diagnose op basis van de mening van de onderzoeker, geïnformeerd door bi-directionele tests en de criteria van de Wereldgezondheidsorganisatie uit 2008 bij gebruik van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit

Uiteindelijke diagnose door de onderzoeker op basis van de WHO-criteria in combinatie met JAK2-evaluatie via BDS

Uiteindelijke diagnose op basis van de WHO-criteria in combinatie met JAK2-evaluatie via de <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	PV (N=56)	Niet-PV (N=160)	Totaal (N=216)
PV	53 (94,6%)	1 (0,6%)	54 (25%)
Niet-PV	1 (1,8%)	153 (95,6%)	154 (71,3%)
Onduidelijk	2 (3,6%)	6 (3,8%)	8 (3,7%)

N: Aantal patiënten gediagnosticeerd door de onderzoeker (geëvalueerde populatie)

De aantallen worden als een absolute waarde uitgedrukt en als percentage van de geëvalueerde populatie (tussen haakjes).

Onduidelijke gevallen

Drie proefpersonen waren wildtype voor JAK2 V617F (zowel met BDS als de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit) en hadden daarnaast lage serum-EPO-gehalten en een onduidelijke beenmerghistologie (twee werden als PV gediagnosticeerd door de onderzoeker en één als niet-PV). Vijf proefpersonen waren JAK2 V617F-wildtype voor BDS en positief bij gebruik van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en er werd geen beenmergbiopsie uitgevoerd (alle vijf waren als niet-PV gediagnosticeerd door de onderzoeker). Ondanks het ontbreken of de onduidelijkheid van de beenmerghistologie werden deze acht gevallen als zijnde strijdig opgenomen in de berekening van de specificiteit en gevoeligheid (tabel 21).

Strijdige gevallen

Bij twee proefpersonen verschilde de diagnose van de onderzoeker met de diagnose die was verkregen met *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit binnen de WHO-diagnosecriteria. Eén proefpersoon had een serum-EPO-gehalte dat binnen het normale bereik ligt (op 16,5 IU/l) en geen JAK2 V617F- of exon 12-mutatie. De proefpersoon was echter gediagnosticeerd met

PV op basis van de mening van de onderzoeker. Eén proefpersoon had een serum-EPO-gehalte onder het normale bereik en een JAK2 V617F-mutatie volgens BDS, maar werd gediagnosticeerd als niet-PV op basis van de mening van de onderzoeker. Volgens het protocol zou de diagnose door de onderzoeker de 2008 WHO-diagnosecriteria strikt moeten volgen. In deze twee strijdige gevallen maakten de onderzoekers echter gebruik van klinisch inzicht bij de interpretatie van het algoritme.

Zoals in tabel 21 is samengevat, was de algehele gevoeligheid van PV-diagnose bij gebruik van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit 94,64% (53/56 proefpersonen; 95% BI: 85,13%, 98,88%), wat aangeeft dat deze assay naar verwachting PV detecteert bij de overgrote meerderheid van proefpersonen met die aandoening. De specificiteit van PV-diagnose tijdens het gebruik van deze assay kwam vergelijkbaar op 95,62% neer (153/160 proefpersonen; 95% BI: 91,19%, 98,22%), wat aangeeft dat deze assay naar verwachting ook PV zal uitsluiten bij de overgrote meerderheid van proefpersonen zonder PV.

Daarnaast werden ook de positieve voorspellende waarde (Positive Predictive Value, PPV) en negatieve voorspellende waarde (Negative Predictive Value, NPV) berekend. De PPV van de kit was 88,33% (53/60 proefpersonen; 95% BI: 77,27%, 93,57%) en de NPV was 98,08 % (153/156 proefpersonen; 95% BI: 94,8%, 99,4%).

Tabel 21. Analyse van gevoeligheid, specificiteit, PPV en NPV (evalueerbare populatie)

Variabel	Schatting (%)	Onderste 95% betrouwbaarheidslimiet (%)	Bovenste 95% betrouwbaarheidslimiet (%)
Gevoeligheid	94,64	85,13	98,88
Specificiteit	95,62	91,19	98,22
PPV	88,33	77,27	93,57
NPV	98,08	94,8	99,4

De waarschijnlijkheidsverhouding van een negatieve test bij gebruik van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit voor diagnose van PV was, binnen de WHO-diagnosecriteria, 21,6 (95% BI; 10,44, 44,71), wat aangeeft dat het JAK2 V617F-positieve resultaat een grotere kans heeft om zich voor te doen bij proefpersonen met PV dan bij personen zonder PV.

De waarschijnlijkheidsverhouding van een positieve test bij gebruik van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit voor diagnose van PV was, binnen de WHO-diagnosecriteria, 0,06 (95% BI; 0,02, 0,18), wat aangeeft dat het JAK2 V617F-negatieve resultaat een kleinere kans heeft om zich voor te doen bij proefpersonen met PV dan bij personen zonder PV.

Conclusie van het klinisch onderzoek

Uit de analyses kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- De gevoeligheid was 94,64% (95% BI; 85,13%, 98,88%) wat aangeeft dat de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit binnen de WHO-diagnosecriteria naar verwachting PV detecteert bij de overgrote meerderheid van proefpersonen met die aandoening.
- De specificiteit van PV-diagnose met behulp van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit binnen de WHO-diagnosecriteria was 95,62% (95% BI; 91,19%, 98,22%), wat aangeeft dat PV naar verwachting ook wordt uitgesloten bij de overgrote meerderheid van proefpersonen zonder PV.
- Wanneer de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit binnen de WHO-diagnosecriteria werd gebruikt, was de PPV 88,33% (95% BI; 77,27%, 93,57%)* en was de NPV 98,08% (95% BI; 94,8%, 99,4%).
- De waarschijnlijkheidsverhouding van een negatieve test bij gebruik van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit voor diagnose van PV was, binnen de WHO-diagnosecriteria, 21,61 (95% BI; 10,44, 44,71), wat aangeeft dat het JAK2 V617F-positieve resultaat een grotere kans heeft om zich voor te doen bij proefpersonen met PV dan bij personen zonder PV.

* De PPV is afhankelijk van de prevalentie. Omdat de prevalentie laag was in de onderzoekspopulatie en de gevoeligheid en specificiteit onafhankelijk zijn van de prevalentie, zijn de gevoeligheid en specificiteit relevanter.

- De waarschijnlijkheidsverhouding van een positieve test bij gebruik van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit voor diagnose van PV was, binnen de WHO-diagnosecriteria, 0,06 (95% BI; 0,02, 0,18), wat aangeeft dat het JAK2 V617F-negatieve resultaat een veel kleinere kans heeft om zich voor te doen bij proefpersonen met PV dan bij personen zonder PV.

Overzicht van veiligheid en prestaties

De paragraaf met het overzicht van veiligheid en prestaties kan worden gedownload via de productpagina van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit: resources.qiagen.com/674623. U kunt deze ook vinden op de EUDAMED-website.

Afvoer

- Gooi afval van het monster en de assay weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.
- Alle chemische en biologische materialen zijn potentieel gevaarlijk. Specimens zijn potentieel gevaarlijk en dienen als biologisch gevaarlijk materiaal te worden behandeld.
- Voer tijdens DNA-extractie gebruikte monsterbuisjes, platen en afval af in overeenstemming met de plaatselijk geldende veiligheidsvoorschriften.
- Stripbuisjes die tijdens het qPCR-protocol werden gebruikt, moeten worden afgevoerd in overeenstemming met de plaatselijk geldende veiligheidsvoorschriften.

Referenties

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.

Gids voor problemen oplossen

Deze gids voor problemen oplossen kan helpen bij het oplossen van eventuele problemen. Ga voor technische ondersteuning en meer informatie naar ons centrum voor technische ondersteuning op www.qiagen.com/Support (kijk voor contactgegevens op www.qiagen.com).

Voor informatie over het oplossen van problemen met betrekking tot de extractiekits QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (cat.nr. 61104) en QIASymphony DSP DNA Mini Kit (cat.nr. 937236), dient u de bijbehorende handleidingen te raadplegen; voor informatie over het oplossen van problemen met de Rotor-Gene AssayManager v2.1, raadpleegt u de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1).

Opmerkingen en suggesties

Geautomatiseerde extractie

- | | |
|--|---|
| a) Monster gemarkeerd als "unclear" (onduidelijk) | Dit kan te maken hebben met een onderbreking tijdens de extractierun. Als de extractierun is voltooid, gaat u verder met de stap voor het meten van de OD-verhouding en de concentratie. Zo niet, dan herhaalt u de extractierun. |
| b) Monster gemarkeerd als "unprocessed" (onverwerkt) | Dit duidt op een fout met het aanvankelijke monstervolume. Controleer het bloedvolume door te pipetteren. Als het volume te klein is, vergroot u het volume, zodat er 300 µl aan monster is. Start vervolgens opnieuw de run. |
| c) Monster gemarkeerd als "invalid" (ongeldig) | Er is een fout opgetreden tijdens de extractierun. Herhaal de extractiestap voor dit monster. |

Opmerkingen en suggesties

- | | | |
|----|--|--|
| d) | Fout met de temperatuur van het koelblok | Als er aan het eind van de run een foutbericht wordt weergegeven over de koeltemperatuur, betekent dit dat de monsters vanaf het eind van de extractierun op kamertemperatuur (15-25 °C) zijn bewaard. Als de monsters gedurende < 12 uur op kamertemperatuur zijn bewaard, mag de kwaliteit van genomisch DNA niet worden aangepast en kan genomisch DNA worden gekwantificeerd. Als > 12 uur is verstreken, zijn de monsters van genomisch DNA mogelijk gedegradeerd. Als dit het geval is, herhaalt u de extractie. |
| e) | Fout bij verwijdering van de elutieplaat | Aan het eind van de run wordt mogelijk een foutbericht weergegeven als de elutieplaat is verwijderd zonder de relevante bewerking op het scherm te selecteren. Dit kunt u herstellen door op het relevante selectievakje te klikken. |

Algemene omgang met betrekking tot de beoordeling van de JAK2-mutatiestatus met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit

Het totaal aantal kopieën stemt niet overeen en het bijbehorende monster is ongeldig: de amplificatie is te laag

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Controleer de verhouding A_{260}/A_{280} | Als dit < 1,7 is, voert u een nieuwe DNA-extractie uit. |
| b) | Controleer de DNA-concentratie | De <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit is geoptimaliseerd voor een werkconcentratie van 10 ng/ μ l.
Als het DNA niet deze concentratie heeft, verdunt u het DNA of extraheert u opnieuw DNA uit het bloed. |
| c) | Als beide parameters voldoen, zijn mogelijk de pipetteervolumes onjuist | Controleer de pipetten en kalibreer deze opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt. |

Opmerkingen en suggesties

Runcontrole mislukt bij een QS-standaard

- a) Flacon omgekeerd
- b) Omkering tijdens distributie
- c) Kruiscontaminatie
- d) Gedeeltelijke degradatie van standaard
- e) Gedeeltelijke degradatie van PCR-reagentia
- f) Niet-specifieke amplificatie

Controleer het pipetteerschema en de opstelling van de reactie. Vervang alle kritieke reagentia en herhaal het experiment door gebruik te maken van nieuwe aliquots. Hanteer monsters, componenten van kits en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven materiaal. Bewaar de inhoud van de kit bij een temperatuur van -30 tot -15 °C en bescherm de reactiemengsels tegen licht. Vermijd herhaaldelijk ontdooien en invriezen.

Geen of zwak signaal voor één standaard

- a) Homogeniteitsprobleem
- b) Gebruik hetzelfde reactiemengsel voor WT- en MT-QS

Controleer het pipetteerschema en de opstelling van de reactie. Herhaal de PCR-run.

De controle zonder template (NTC) van water toont een positieve amplificatie aan

- a) Kruiscontaminatie
- b) Besmetting van reagentia
- c) Omkering van stripbuisjes (buisjes die *JAK2 V617F*-positieve template bevatten in de NTC-positie geplaatst)
- d) Probedegradatie

Vervang alle kritieke reagentia. Hanteer monsters, componenten van kits en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven materiaal. Controleer het pipetteerschema en de opstelling van de reactie. Bescherm reactiemengsels tegen licht. Controleer de fluorescentiecurve op fout-positieven.

Opmerkingen en suggesties

Geen signaal, zelfs niet in de standaardcontroles

Pipetteerfout of reagentia vergeten

Controleer het pipetteerschema en de opstelling van de reactie.
Herhaal de PCR-run.

Signalen afwezig of laag in monsters voor de IC en/of het totaal aantal kopieën (TCN) onder het validiteitsbereik, maar de runcontroles zijn geldig

Remmende effecten van het monstermateriaal veroorzaakt door onvoldoende zuivering

Controleer altijd de DNA-kwaliteit door de verhouding A_{260}/A_{280} en de concentratie te meten voordat u begint.
Herhaal de DNA-bereiding.

Wildtypecontrole (WTC) is positief, maar mutantcontrole (MTC) is niet positief genoeg

Contaminatie door achtergebleven materiaal

Vervang alle kritieke reagentia.
Herhaal de proef met nieuwe aliquots van alle reagentia.
Hanteer monsters, componenten van kits en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven materiaal.
Zorg ervoor dat de tips worden verwisseld voordat een andere reagens wordt gepipetteerd.

Opmerkingen en suggesties

Wildtypecontrole (WTC) geamplificeerd met het MT-reactiemengsel (in plaats van het WT-reactiemengsel) en mutantcontrole (MTC) geamplificeerd met het WT-reactiemengsel (in plaats van het MT-reactiemengsel)

- | | |
|---|---|
| a) Kruiscontaminatie | Vervang alle kritieke reagentia. |
| b) Besmetting van reagentia | Herhaal de proef met nieuwe aliquots van alle reagentia. |
| c) Omkering van buisjes (buisjes met WTC in de MTC-positie geplaatst en andersom) | Hanteer monsters, componenten van kits en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven materiaal.
Controleer het pipetteerschema en de opstelling van de reactie. |

Omgekeerde detectie van de positieve controle












- | | |
|--|---|
| a) Kruiscontaminatie | Vervang alle kritieke reagentia en herhaal het experiment door gebruik te maken van nieuwe aliquots. |
| b) Omgekeerde distributie van het reactiemengsel in het buisje of voormengsel. | Hanteer monsters, componenten van kits en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven materiaal.
Controleer het pipetteerschema en de opstelling van de reactie. |

Geen signaal voor een monster of controle, zelfs niet voor de interne controle

- | | |
|--|---|
| a) Het reactiemengsel of een van de componenten ervan (bijv. Taq-polymerase) niet toegevoegd | Controleer het pipetteerschema en de opstelling van de reactie. Als de interne controle niet wordt geamplificeerd, is het reactiemengsel niet toegevoegd of gedegradеerd. |
| b) Reactiemengsel is gedegradеerd | Herhaal de qPCR-stap met een nieuw reactiemengsel. |

Symbolen

De volgende symbolen worden in de gebruiksaanwijzing of op de verpakking en etiketten weergegeven:

Symbol	Symboldefinitie
	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Dit product voldoet aan de vereisten van de Europese regelgeving 2017/746 inzake in-vitrodiagnostische medische hulpmiddelen.
	In-vitrodiagnostisch medisch hulpmiddel
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer (m.b.t. labeling van componenten)
	Artikelnummer wereldhandel
	Uniek hulpmiddel-identificatienummer
	Bevat
	Component

Symbol

Symboldefinitie



Nummer

Rn

'R' staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing; 'n' is het revisienummer



Temperatuurbepering



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksinstructies, die u kunt downloaden via resources.qiagen.com/674623



Bescherm tegen licht



Voorzichtig, raadpleeg de meegeleverde documentatie

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Voor 24 reacties: Wildtype-JAK2-gencontrole, JAK2 V617F-controlegen, JAK2 WT-kwantificatiestandaarden, JAK2 MT-kwantificatiestandaarden, JAK2 WT-reactiemengsel, JAK2 MT-reactiemengsel, Taq DNA-polymerase, TE-buffer voor verdunning, water voor NTC	674623
Verwante producten		
Rotor-Gene Q MDx – voor IVD-gevalideerde, real-time PCR-analyse in klinische toepassingen		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler en High Resolution Melt-analysator met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, karmijnrood) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler en High Resolution Melt-analysator met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, karmijnrood) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Software voor routinetests in combinatie met de Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Software met enkele licentie voor installatie op één computer	9025620

Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminium blok voor handmatig opzetten van reacties met een enkelkanaals pipet in 72 buisjes van 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 1000 reacties	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 10.000 reacties	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Voor 50 bereidingen: QIAamp Mini Spin Columns, buffers, reagentia, buisjes, VacConnectors	61104
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit	Voor 192 bereidingen van elk 200 µl: Bevat 2 reagenscartridges en enzymrekken en accessoires.	937236
QIAsymphony SP and accessories		
QIAsymphony SP System	QIAsymphony-module voor monsterbereiding: bevat installatie en opleiding, 1 jaar garantie op onderdelen en werk	9001751
QIAsymphony SP	QIAsymphony-module voor monsterbereiding: bevat 1 jaar garantie op onderdelen en werk	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-wells monsterbereidingscartridges voor gebruik met de QIAsymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers voor gebruik met de QIAsymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Wegwerpfiltertips, in een rek; (8 x 128). Voor gebruik in combinatie met de QIAcube®- en QIAsymphony SP/AS-instrumenten	990332

Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Wegwerpfiltertips, in een rek; (8 × 128). Voor gebruik in combinatie met de QIASymphony SP/AS-instrumenten	997024
Elution Microtubes CL (24 × 96)	Niet-steriele buisjes van polypropyleen (0,85 ml maximumcapaciteit, minder dan 0,7 ml opslagcapaciteit, 0,4 ml elutiecapaciteit); 2304 in rekken van 96; inclusief doppenstrips	19588
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 eenheden/ml, oplossing)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml lysisbuffer voor weefsels voor 1000 bereidingen	19076

Raadpleeg voor bijgewerkte licentie-informatie en productspecifieke disclaimers de desbetreffende gebruiksaanwijzingen van de QIAGEN-kit. De gebruiksaanwijzingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Revisiegeschiedenis van document

Revisie	Beschrijving
R1, juli 2022	Eerste uitgave

Beperkte licentieovereenkomst voor de *ipsogen*[®] JAK2 RGQ PCR Kit

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van het product zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product en deze gebruiksaanwijzing zijn meegeleverd, en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich in de panel bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van deze panel te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij de panel zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze gebruiksaanwijzing zijn meegeleverd, en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com. Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers beschikbaar gesteld voor QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet uitgebreid door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en kan evenmin waarborgen dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat dit paneel en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Dit paneel en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN verwierpt uitdrukkelijk alle andere licenties, expliciet of impliciet, dan die uitdrukkelijk zijn vermeld.
5. De koper en gebruiker van het paneel gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen en niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met het paneel en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Kijk op www.qiagen.com voor actuele licentievoorwaarden.

Handelsmerken: QIAGEN[®], *ipsogen*[®] QIAamp[®], QIAcube[®], QIASymphony[®], HotStarTaq[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®] (QIAGEN Group); SYBR[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.); Sarstedt[®] (Sarstedt AG & Co). De gedeponeerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, moeten altijd als wettelijk beschermd worden beschouwd, zelfs als ze niet specifiek als zodanig zijn aangegeven.

07/2022 HB-2872-001 1123592 © 2022 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

Bestellen www.qiagen.com/shop | Technische ondersteuning support.qiagen.com |
Website www.qiagen.com