

# Οδηγίες χρήσης για το *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 RGQ PCR Kit



Έκδοση 2

**IVD**

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με το όργανο Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM

**CE**

0197

**REF**

674623



QIAGEN, GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R1 **MAT**

1123592EL



# Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση .....	6
Αρμόδιος χρήστης .....	6
Περιγραφή και αρχή λειτουργίας.....	7
Σύνοψη και επεξήγηση.....	7
Αρχή της διαδικασίας .....	11
Υλικά που παρέχονται .....	16
Περιεχόμενα του κιτ.....	16
Περιεχόμενα του κιτ (συνέχεια) .....	17
Συστατικά του κιτ.....	18
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται .....	20
Αναλώσιμα και αντιδραστήρια για χειροκίνητη εκχύλιση DNA.....	20
Αναλώσιμα και αντιδραστήρια για αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA .....	20
Αναλώσιμα και αντιδραστήρια για PCR.....	20
Εξοπλισμός .....	21
Εξοπλισμός για την παρασκευή δειγμάτων .....	21
Εξοπλισμός για την εκτέλεση real-time PCR.....	21
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	22
Πληροφορίες ασφάλειας.....	22
Πληροφορίες σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης.....	22
Προφυλάξεις.....	23
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων .....	26
Συνθήκες μεταφοράς.....	26

Συνθήκες αποθήκευσης .....	26
Σταθερότητα κατά τη χρήση .....	27
Φύλαξη και χειρισμός δοκιμίων .....	28
Δείγματα ολικού αίματος .....	28
Δείγματα γονιδιωματικού DNA .....	28
Πρωτόκολλο: Εκχύλιση γονιδιωματικού DNA και παρασκευή από ολικό αίμα .....	29
Χειροκίνητη εκχύλιση γονιδιωματικού DNA με χρήση του QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit .....	29
Αυτοματοποιημένη εκχύλιση γονιδιωματικού DNA με χρήση του QIASymphony DSP DNA Mini Kit.....	34
Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	40
Κανονικοποίηση δείγματος γονιδιωματικού DNA .....	40
Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.....	41
Εγκατάσταση του λογισμικού πυρήνα Rotor-Gene AssayManager v2.1.....	42
Εγκατάσταση του Gamma Plug-in και εισαγωγή του προφίλ προσδιορισμού.....	43
Επεξεργασία δειγμάτων σε όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM με ρότορα 72 σωληναρίων .....	46
qPCR στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM με ρότορα 72 σωληναρίων.....	49
Ερμηνεία αποτελεσμάτων .....	65
Περιορισμοί .....	72
Χαρακτηριστικά απόδοσης .....	74
Απόδοση ανάλυσης .....	74
Εξέταση του διεθνούς πίνακα αναφοράς του ΠΟΥ για γονιδιωματική JAK2 V617F (NIBSC, κωδικός πίνακα 16/120).....	82
Κλινική απόδοση .....	89

Σύνοψη ασφάλειας και απόδοσης.....	96
Απόρριψη .....	97
Βιβλιογραφία .....	98
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	100
Σύμβολα .....	105
Πληροφορίες παραγγελίας .....	107
Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου .....	110

## Προβλεπόμενη χρήση

Το *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 RGQ PCR Kit είναι ένας ποσοτικός in vitro προσδιορισμός PCR που προορίζεται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της μετάλλαξης JAK2 V617F/G1849T σε γονιδιωματικό DNA το οποίο εκχυλίζεται από ανθρώπινο περιφερικό ολικό αίμα με αντιπηκτικό 2K-EDTA. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit προορίζονται για χρήση σε συνδυασμό με αξιολόγηση για πιθανολογούμενη μυελοϋπερπλαστική νεοπλασία (MYN) αρνητική στο χρωμόσωμα Philadelphia (Ph) και μοριακή παρακολούθηση της νόσου σε ασθενείς με MYN. Κάθε παραγόμενο διαγνωστικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται στο πλαίσιο των υπόλοιπων κλινικοπαθολογικών ευρημάτων.

Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit προορίζεται για χρήση αποκλειστικά με το όργανο QIAGEN Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM και άλλα συστατικά επικυρωμένων ρών εργασίας, όπως περιγράφονται στις οδηγίες χρήσης. Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit δεν είναι αυτοματοποιημένο προϊόν, ωστόσο, η ανάλυση υποβοηθείται από ειδικό λογισμικό.

Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση.

## Αρμόδιος χρήστης

Το kit αυτό προορίζεται για επαγγελματική χρήση.

Το προϊόν θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνον από επαγγελματίες με ειδική κατάρτιση και εκπαίδευση σε τεχνικές μοριακής βιολογίας, εξοικειωμένους με την τεχνολογία αυτή. Η διαδικασία χρήσης του προϊόντος περιλαμβάνει εφαρμογή σε περιβάλλον εργαστηρίου μοριακής βιολογίας.

# Περιγραφή και αρχή λειτουργίας

## Σύνοψη και επεξήγηση

Μια επανεμφανιζόμενη σωματική μετάλλαξη, η *V617F*, που επηρεάζει το γονίδιο Janus τυροσινικής κινάσης 2 (*JAK2*), αναγνωρίστηκε το 2005 (1–4), οδηγώντας σε ένα σημαντικό επίτευγμα στην κατανόηση, την ταξινόμηση και τη διάγνωση της ΜΥΝ. Το *JAK2* είναι ένα καθοριστικό μόριο ενδοκυτταρικής σηματοδότησης για έναν αριθμό κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένης της ερυθροποιητίνης.

Η μετάλλαξη *JAK2 V617F* ανιχνεύεται σε >95% των ασθενών με αληθή πολυκυτταραιμία (Polycythemia Vera, PV) και σε περίπου 60% των ασθενών με ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία (Essential Thrombocythemia, ET) και πρωτοπαθή μυελοϊνώση (Primary Myelofibrosis, PMF) (5). Η *JAK2 V617F* έχει επίσης ανιχνευθεί σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας, μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου (ΜΔΣ), συστηματικής μαστοκυττάρωσης και χρόνιας ουδετεροφιλικής λευχαιμίας αλλά σε 0% περιπτώσεων χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ) (6).

Η μετάλλαξη *JAK2 V617F* συνίσταται σε μια μονονουκλεοτιδική αλλαγή του *JAK2* νουκλεοτιδίου 1849 στο εξόνιο 14 που προκαλεί μια μοναδική αντικατάσταση βαλίνης (V) από φαινυλαανίνη (F) στη θέση 617 της πρωτεΐνης (περιοχή JH2). Το γονίδιο *JAK2* κωδικοποιεί μια τυροσινική κινάση που συμμετέχει στη σηματοδότηση του υποδοχέα κυτοκίνης στην οδό STAT. Κατά τη συστατική ενεργοποίηση, συνήθως λόγω της μετάλλαξης *JAK2 V617F*, το αποτέλεσμα είναι μετασχηματισμός ερυθροειδών προγονικών κυττάρων, υπερευαισθησία στην ερυθροποιητίνη και ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών οδών. Επίσης, εικάζεται ότι το απορυθμισμένο *JAK2* υποκινεί ογκογονιδιακή έκφραση, μιτωτικό ανασυνδυασμό και γενετική αστάθεια (7).

Παραδοσιακά, η διάγνωση των ΜΥΝ βασίζεται σε κλινικά κυτταρογενετικά και ιστολογικά κριτήρια του μυελού των οστών. Η ανακάλυψη του ειδικού για τη νόσο μοριακού δείκτη οδήγησε σε απλούστευση της διαδικασίας και βελτίωση της διαγνωστικής ακρίβειας. Η ανίχνευση της μετάλλαξης *JAK2 V617F* ανήκει πλέον στα κριτήρια αναφοράς του

Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) 2016 για τη διάγνωση BCR-ABL αρνητικής MYN (8) (Πίνακας 1) και η παρουσία αυτής της μετάλλαξης αποτελεί βασικό κριτήριο για τη διαγνωστική επιβεβαίωση.

### Πίνακας 1. Κριτήρια του ΠΟΥ για τη διάγνωση MYN

#### Κριτήρια για διάγνωση PV

Κύρια	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Αιμοσφαιρίνη (Hgb) &gt;16,5 g/dL (άνδρες) ή &gt;16,0 g/dL (γυναίκες) ή αιματοκρίτης &gt;49% (άνδρες) ή &gt;48% (γυναίκες) ή αυξημένη μάζα ερυθρών αιμοσφαιρίων &gt;25% πάνω από τη μέση φυσιολογική προβλεπόμενη τιμή.</li> <li>2. Βιοψία μυελού των οστών (ΜΟ) που παρουσιάζει υπερκυτταροβρίθεια για ηλικία με ανάπτυξη τριών κυτταρικών σειρών (πανμύελωση) συμπεριλαμβανομένου εξέχοντος πολλαπλασιασμού ερυθροειδών, κοκκιοκυτταρικού πολλαπλασιασμού και μεγακαρουκυτταρικού πολλαπλασιασμού με πλειομορφικά, ώριμα μεγακαρουκύτταρα (διαφορές στο μέγεθος).</li> <li>3. <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Παρουσία της μετάλλαξης <i>JAK2 V617F</i> ή μετάλλαξης του εξονίου 12 του <i>JAK2</i>.</span></li> </ol>
-------	--

Δευτερεύοντα Επίπεδο ερυθροποιητίνης στον ορό χαμηλότερο του κανονικού

Η διάγνωση της PV απαιτεί να πληρούνται ή και τα 3 κύρια κριτήρια ή τα πρώτα 2 κύρια κριτήρια και το δευτερεύον κριτήριο†.

† Το κριτήριο με αριθμό 2 (βιοψία ΜΟ) ενδέχεται να μην απαιτείται σε περιπτώσεις με παρατεταμένη απόλυτη ερυθροκυττάρωση: επίπεδα αιμοσφαιρίνης >18,5 g/dL στους άνδρες (αιματοκρίτης, 55,5%) ή >16,5 g/dL στις γυναίκες (αιματοκρίτης, 49,5%) αν υφίσταται το κύριο κριτήριο 3 και το δευτερεύον κριτήριο. Ωστόσο, η αρχική μυελοϊνώση (παρούσα σε έως 20% των ασθενών) μπορεί να ανιχνευτεί μόνο με διενέργεια βιοψίας ΜΟ και το εύρημα αυτό μπορεί να προβλέψει μια ταχύτερη εξέλιξη από της έκδηλης μυελοϊνώσης (μετα-PV MF).

#### Κριτήρια για διάγνωση ET

Κύρια	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Αριθμός αιμοπεταλίων <math>\geq 450 \times 10^9/L</math></li> <li>2. Βιοψία ΜΟ που παρουσιάζει πολλαπλασιασμό κυρίως της σειράς των μεγακαρουκυττάρων με αυξημένους αριθμούς διογκωμένων, ώριμων μεγακαρουκυττάρων με υπερλοβώδεις πυρήνες. Μη σημαντική αύξηση ή αριστερή μετατόπιση στην κοκκιοκυτταροποίηση ή την ερυθροποίηση των ουδετερόφιλων και πολύ σπάνια μικρή (κατηγορίας 1) αύξηση ινών ρετικουλίνης.</li> <li>3. Μη ικανοποίηση των κριτηρίων του ΠΟΥ για <i>BCR-ABL1*</i> ΧΜΛ, PV, PMF, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα ή άλλο μυελοειδές νεόπλασμα.</li> <li>4. <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Παρουσία μετάλλαξης <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ή <i>MPL</i></span></li> </ol>
-------	--

Δευτερεύοντα Παρουσία κλωνικού δείκτη ή καμία παρουσία αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης.

Η διάγνωση της ET απαιτεί να πληρούνται ή και τα 4 κύρια κριτήρια ή τα πρώτα 3 κύρια κριτήρια και το δευτερεύον κριτήριο.



## Κριτήρια για διάγνωση προ-PMF

Κύρια	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Πολλαπλασιασμός μεγακαρουκυττάρων και ατυπία, χωρίς ίνωση ρετικουλίνης &gt; κατηγορίας 1, που συνοδεύονται από αυξημένη ηλικιακά προσαρμοσμένη κυτταροβρίθεια ΜΟ, κοκκιοκυτταρικό πολλαπλασιασμό και συχνά μειωμένη ερυθροποίηση.</li><li>2. Μη ικανοποίηση των κριτηρίων του ΠΟΥ για <i>BCR-ABL1*</i> ΧΜΛ, ΡV, ΕΤ, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα ή άλλο μυελοειδές νεόπλασμα.</li><li>3. Παρουσία μετάλλαξης <i>JAK2</i>, <i>CALR</i>, <i>MPL</i> ή, απουσία αυτών των μεταλλάξεων, παρουσία άλλου κλωνικού δείκτη† ή απουσία ελάσσονος αντιδραστικής ίνωσης ρετικουλίνης ΜΟ‡</li></ol>
-------	---

Δευτερεύοντα	Παρουσία τουλάχιστον ενός από τα παρακάτω, επιβεβαιωμένου σε 2 διαδοχικούς προσδιορισμούς: <ol style="list-style-type: none"><li>a.) Αναιμία που δεν αποδίδεται σε συννοσηρότητα</li><li>b.) Λευκοκυττάρωση <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li><li>c.) Ψηλαφητή σπληνομεγαλία</li><li>d.) Αυξημένη γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) πάνω από το ανώτατο φυσιολογικό όριο του επιστημονικού εύρους αναφοράς</li></ol>
--------------	--

Η διάγνωση της προ-PMF απαιτεί να πληρούνται και τα 3 κύρια κριτήρια και τουλάχιστον 1 δευτερεύον κριτήριο.

† Σε περίπτωση απουσίας οποιασδήποτε από τις 3 κύριες κλωνικές μεταλλάξεις, η αναζήτηση των πλέον συχνών συνοδών μεταλλάξεων (π.χ., *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό της κλωνικής φύσης της νόσου.

‡ Ελάσσων (κατηγορίας 1) ίνωση ρετικουλίνης δευτερογενής σε λοίμωξη, αυτοάνοση διαταραχή ή άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, λευχαιμία τριχωτών κυττάρων ή άλλο λεμφοειδές νεόπλασμα, μεταστατική κακοήθεια ή τοξικές (χρόνιες) μυελοπάθειες.

## Κριτήρια για διάγνωση έκδηλης PMF

Κύρια	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Παρουσία πολλαπλασιασμού μεγακαρυοκυττάρων και ατυπίας που συνοδεύονται από ίνωση ή ρετικουλίνης ή/και κολλαγόνου κατηγορίας 2 ή 3.</li><li>2. Μη ικανοποίηση των κριτηρίων του ΠΟΥ για ET, PV, <i>BCR-ABL1+</i> ΧΜΛ, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα ή άλλο μυελοϊδές νεόπλασμα.</li><li>3. Παρουσία μετάλλαξης <i>JAK2</i>, <i>CALR</i>, <i>MPL</i> ή, απουσία αυτών των μεταλλάξεων, παρουσία άλλου κλωνικού δείκτη<sup>†</sup> ή απουσία αντιδραστικής μυελοϊνώσεως<sup>‡</sup>.</li></ol>
-------	---

Δευτερεύοντα	Παρουσία τουλάχιστον ενός από τα παρακάτω, επιβεβαιωμένου σε 2 διαδοχικούς προσδιορισμούς: <ol style="list-style-type: none"><li>a.) Αναιμία που δεν αποδίδεται σε συννοσηρότητα</li><li>b.) Λευκοκυττάρωση <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li><li>c.) Ψηλαφητή σπληνομεγαλία</li><li>d.) Αυξημένη γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) πάνω από το ανώτατο φυσιολογικό όριο του επιστημονικού εύρους αναφοράς</li><li>e.) Λευκοερυθροβλάστωση</li></ol>
--------------	--

Η διάγνωση της έκδηλης PMF απαιτεί να πληρούνται και τα 3 κύρια κριτήρια και τουλάχιστον 1 δευτερεύον κριτήριο.

<sup>†</sup> Σε περίπτωση απουσίας οποιασδήποτε από τις 3 κύριες κλωνικές μεταλλάξεις, η αναζήτηση των πλέον συχνών συνοδών μεταλλάξεων (π.χ., *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό της κλωνικής φύσης της νόσου.

<sup>‡</sup> Ίνωση ΜΟ ρετικουλίνης δευτερογενής σε λοίμωξη, αυτοάνοση διαταραχή ή άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, λευχαιμία τριχωτών κυττάρων ή άλλο λεμφοϊδές νεόπλασμα, μεταστατική κακοήθεια ή τοξικές (χρόνιες) μυελοπάθειες.

**Σημείωση:** ΧΜΛ: Χρόνια μυελογενής λευχαιμία, ET: Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία, PMF: Πρωτοπαθής μυελοϊνώση, PV: Αληθής πολυκυτταραιμία, ΠΟΥ: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

Επιπλέον, η ανακάλυψη της μετάλλαξης *JAK2 V617F* σε ασθενείς με MYN έχει αποκαλύψει έναν νέο στόχο θεραπειών. Η μοριακή παρακολούθηση της νόσου που μετρά το φορτίο της μετάλλαξης *JAK2 V617F* έχει καταδειχθεί χρήσιμη στην αξιολόγηση της απόκρισης στη θεραπεία και στην πρόβλεψη της υποτροπής σε ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση αλλογενών βλαστοκυττάρων (9). Οι έννοιες της μοριακής απόκρισης καθορίζονται σαφώς από τις πιο πρόσφατες συστάσεις των European LeukemiaNet (ELN) και International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment

(IWG-MRT) (10, 11) και αναφέρονται στις κατευθυντήριες οδηγίες του Εθνικού Γενικού Αντικαρκινικού Δικτύου των ΗΠΑ (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) (12) και της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας (European Society of Medical Oncology, ESMO) (5). Ως πλήρης μοριακή απόκριση ορίστηκε η εξάλειψη προϋπάρχουσας μοριακής ανωμαλίας και ως μερική μοριακή απόκριση η μείωση  $\geq 50\%$  στο φορτίο μεταλλαγμένων αλληλόμορφων *JAK2 V617F* (η μερική απόκριση αφορά μόνο ασθενείς με τουλάχιστον 20% φορτίο μεταλλαγμένων αλληλόμορφων *JAK2 V617F* στη γραμμή βάσης) (10,11).

Από το 2006 διατίθενται αρκετές μέθοδοι που ουσιαστικά βασίζονται σε τεχνικές PCR ή αλληλούχισης, υπό μορφή εργαστηριακά ανεπτυγμένων δοκιμασιών για την ανίχνευση της παρουσίας και την πιθανή ποσοτικοποίηση της *JAK2 V617F*. Οι δοκιμασίες έχουν διαφορετική απόδοση ανάλυσης, ειδικά όσον αφορά την ακρίβεια και το επίπεδο ευαισθησίας. Η διαφορά ενδέχεται να επηρεάσει την ανάγκη για ανάλυση του μυελού των οστών, τον χρόνο που απαιτείται για την επίτευξη τελικής διάγνωσης και, πιθανώς, την απόδοση της διαγνωστικής και μοριακής παρακολούθησης της νόσου.

Με δεδομένο το μεγάλο εύρος πιθανών κλασμάτων μεταλλαγμένων αλληλόμορφων *JAK2 V617F* που μπορεί να εμφανιστούν στα MYN (με επίπεδα που αγγίζουν έως και το 1%), τα εργαστήρια ενθαρρύνονται να παρέχουν την εξέταση για τη μετάλλαξη *JAK2 V617F* με υψηλή αναλυτική ευαισθησία. Οι κατάλληλες τεχνικές πρέπει να διαθέτουν χαμηλό όριο ανίχνευσης (τουλάχιστον 1% για τη διάγνωση και τουλάχιστον 0,1% για τη μοριακή παρακολούθηση της νόσου) και υψηλή αναπαραγωγιμότητα (5,13).

## Αρχή της διαδικασίας

Έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αναλογίας των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) στα δείγματα DNA. Ορισμένες, όπως οι καμπύλες αποδιάταξης και η αλληλούχιση, είναι μόνο ημιποσοτικές. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ποσοτική real-time PCR (qPCR) είναι προτιμητέες λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας τους. Η χρήση ενός ειδικού για SNP εκκινητή επιτρέπει την επιλεκτική ενίσχυση μεταλλαγμένου (MT) αλληλόμορφου ή αλληλόμορφου άγριου τύπου (WT), το οποίο είναι

εύκολα ανιχνεύσιμο σε ένα όργανο real-time qPCR. Έτσι επιτρέπεται ευαισθησία <0,1%, η οποία συμφωνεί με την τρέχουσα αποδεκτή αποκοπή 1% του JAK2 που χρησιμοποιείται για την κλινική θετικότητα των διαγνώσεων και το συνιστώμενο όριο ανίχνευσης του φορτίου αλληλόμορφων *JAK2 V617F*  $\leq 0,1\%$  για τη μοριακή παρακολούθηση της νόσου (5,13). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένοι κλινικοί εμπειρογνώμονες θεωρούν κλινικά σημαντική την παρουσία οποιουδήποτε φορτίου *JAK2 V617F* τη χρονική στιγμή της διάγνωσης, δικαιολογώντας έτσι την ανάγκη μιας ευαίσθητης μεθόδου όπως η qPCR (14). Το *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* βασίζεται σε αυτήν την τεχνική.

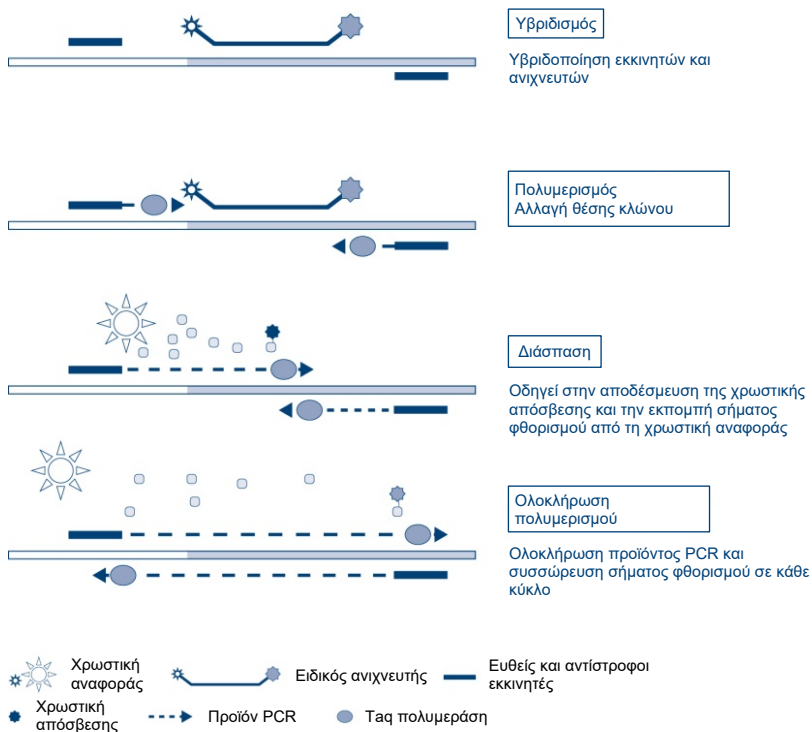
Η χρήση qPCR επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της διεργασίας ενίσχυσης PCR. Η ποσοτική PCR μπορεί να προσφέρει δεδομένα γρήγορα, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, μέσω ανίχνευσης σημάτων φθορισμού σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια ή/και μετά τους κύκλους ενίσχυσης, χαρακτηριστικό που μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο μόλυνσης των προϊόντων της PCR. Σήμερα υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι τεχνικών qPCR: ανάλυση qPCR με χρήση χρωστικής SYBR® Green I, ανάλυση qPCR με χρήση ανιχνευτών υδρόλυσης και ανάλυση qPCR με χρήση ανιχνευτών υβριδοποίησης.

Ο προσδιορισμός της QIAGEN χρησιμοποιεί την αρχή της υδρόλυσης ολιγονουκλεοτιδίων ποσοτικής PCR. Κατά την αντίδραση PCR, ευθείς και αντίστροφοι εκκινητές υβριδοποιούνται σε μια ειδική αλληλουχία. Στο ίδιο μείγμα περιλαμβάνεται και ένα άλλο ολιγονουκλεοτίδιο με χρωστική. Αυτός ο ανιχνευτής, που αποτελείται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο σηματοδοτημένο με μια χρωστική αναφοράς στο άκρο 5' και έναν καθοδικό παρεμποδιστή στο άκρο 3' χωρίς χρωστική, υβριδοποιείται σε μια αλληλουχία-στόχο εντός του προϊόντος της PCR. Η ανάλυση qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης αξιοποιεί τη δραστηριότητα 5'→3' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης του *Thermus aquaticus* (*Taq*). Όταν ο ανιχνευτής είναι ακέραιος, η εγγύτητα της χρωστικής αναφοράς με τον παρεμποδιστή συνεπάγεται καταστολή του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς, κυρίως μέσω μεταφοράς ενέργειας τύπου Förster.

Στη διάρκεια της PCR, αν ο εξεταζόμενος στόχος είναι παρών, ο ευθύς και ο αντίστροφος εκκινήτης ανασυνδέονται ειδικά και περιβάλλουν τον ανιχνευτή. Η δραστηριότητα 5'→3' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης διασπά τον ανιχνευτή ανάμεσα στη χρωστική αναφοράς και τον παρεμποδιστή μόνον εάν τα τρία ολιγονουκλεοτίδια υβριδοποιηθούν στον στόχο. Τα τμήματα του ανιχνευτή εκτοπίζονται κατόπιν από τον στόχο και ο πολυμερισμός του κλώνου συνεχίζεται. Το άκρο 3' του ανιχνευτή είναι φραγμένο προκειμένου να αποφευχθεί η επιμήκυνση του ανιχνευτή κατά τη διάρκεια της PCR (Εικόνα 1). Η διαδικασία αυτή προκύπτει σε κάθε κύκλο και δεν επηρεάζει την εκθετική συσσώρευση του προϊόντος.

Αύξηση του σήματος φθορισμού ανιχνεύεται μόνον όταν η αλληλουχία-στόχος είναι συμπληρωματική προς τους εκκινήτες και τον ανιχνευτή και, συνεπώς, ενισχύεται με την PCR. Λόγω των απαιτήσεων αυτών, δεν ανιχνεύεται μη ειδική ενίσχυση. Έτσι η αύξηση του φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη της ενίσχυσης του στόχου με την PCR.

Στην qPCR, ο αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για την ανίχνευση ενός σήματος πάνω από το κατώφλι ονομάζεται σημείο διασταύρωσης Crossing point (CP) ή τιμή κατωφλίου κύκλου Cycle threshold (CT) και είναι ευθέως ανάλογος με την ποσότητα του στόχου που είναι παρών κατά την έναρξη της αντίδρασης.



**Εικόνα 1. Αρχή της αντίδρασης.** Η ειδική για αλληλόμορφα τεχνολογία ποσοτικής PCR που χρησιμοποιείται σε αυτό το κιτ προσδιορισμού επιτρέπει την ευαίσθητη, ακριβή και ιδιαίτερα αναπαραγώγιμη ανίχνευση των SNP. Αυτή η τεχνική βασίζεται στη χρήση ειδικών αντίστροφων εκκινητών για αλληλόμορφο άγριου τύπου και V617F αντίστοιχα (15). Μόνο η τέλεια αντιστοίχιση εκκινητή και DNA-στόχου επιτρέπει την επέκταση και ενίσχυση στην αντίδραση PCR (Εικόνα 2).

## Μείγμα αντίδρασης WT



## Μείγμα αντίδρασης MT



**Εικόνα 2. Ειδική για αλληλόμορφο PCR.** Η χρήση άγριου τύπου ή εκκινητών και μείγματος ανιχνευτών V617F επιτρέπει την ειδική ανίχνευση αλληλόμορφου άγριου τύπου ή μεταλλαγμένου αλληλόμορφου σε δύο ξεχωριστές αντιδράσεις που διεξάγονται με χρήση του ίδιου δείγματος. Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως ποσοστό των μεταλλαγμένων αντιγράφων επί των συνολικών αντιγράφων JAK2. **MT:** μεταλλαγμένο, **WT:** άγριου τύπου.

# Υλικά που παρέχονται

## Περιεχόμενα του kit

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit

24

Αρ. καταλόγου

674623

Χρώμα	Αναγνωριστικό	Αναγνωριστικό σωληναρίου	Όγκος
Κόκκινο	JAK2 Mutant Control (Μάρτυρας μεταλλαγμένου τύπου JAK2) (100% αλληλόμορφο V617F)	MT Ctrl	33 µl
Πράσινο	JAK2 WT Control (Μάρτυρας JAK2 WT) (100% αλληλόμορφο άγριου τύπου)	WT Ctrl	33 µl
Κόκκινο	JAK2 MT Quant Standard 1 (Πρότυπο ποσοτικοποίησης 1 JAK2 MT) (5 x 10 <sup>1</sup> V617F αντίγραφα/5 µl)	MT QS1	20 µl
Κόκκινο	JAK2 MT Quant Standard 2 (Πρότυπο ποσοτικοποίησης 2 JAK2 MT) (5 x 10 <sup>2</sup> V617F αντίγραφα/5 µl)	MT QS2	20 µl
Κόκκινο	JAK2 MT Quant Standard 3 (Πρότυπο ποσοτικοποίησης 3 JAK2 MT) (5 x 10 <sup>3</sup> V617F αντίγραφα/5 µl)	MT QS3	20 µl
Κόκκινο	JAK2 MT Quant Standard 4 (Πρότυπο ποσοτικοποίησης 4 JAK2 MT) (5 x 10 <sup>4</sup> V617F αντίγραφα/5 µl)	MT QS4	20 µl
Πράσινο	JAK2 WT Quant Standard 1 (Πρότυπο ποσοτικοποίησης 1 JAK2 WT) (5 x 10 <sup>1</sup> άγριου τύπου αντίγραφα/5 µl)	WT QS1	20 µl



## Περιεχόμενα του KIT (συνέχεια)

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit

24

Αρ. καταλόγου

674623

Χρώμα	Αναγνωριστικό	Αναγνωριστικό σωληναρίου	Όγκος
Πράσινο	JAK2 WT Quant Standard 2 (Πρότυπο ποσοτικοποίησης 2 JAK2 WT) (5 x 10 <sup>2</sup> άγριου τύπου αντίγραφα/5 μl)	WT QS2	20 μl
Πράσινο	JAK2 WT Quant Standard 3 (Πρότυπο ποσοτικοποίησης 3 JAK2 WT) (5 x 10 <sup>3</sup> άγριου τύπου αντίγραφα/5 μl)	WT QS3	20 μl
Πράσινο	JAK2 WT Quant Standard 4 (Πρότυπο ποσοτικοποίησης 4 JAK2 WT) (5 x 10 <sup>4</sup> άγριου τύπου αντίγραφα/5 μl)	WT QS4	20 μl
Κόκκινο	JAK2 MT Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης JAK2 MT)	MT Mix	1.010 μl
Πράσινο	JAK2 WT Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης JAK2 WT)	WT Mix	1.010 μl
Ανοιχτό πράσινο	Taq DNA polymerase (Taq DNA πολυμεράση) (HotStarTaq® 5 μονάδες/μl)	Taq	85 μl
Λευκό	TE buffer for sample dilution (Ρυθμιστικό διάλυμα TE για αραίωση των δειγμάτων)	TE	1,9 ml
Λευκό	Water for no template control (NTC) (Νερό για μάρτυρα χωρίς μήτρα)	NTC	1,9 ml
Εγχειρίδιο « <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit» (στα Ελληνικά)			1

## ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΙΤ

Τα κυριότερα συστατικά του κιτ περιγράφονται παρακάτω.

**Πίνακας 2. Παρεχόμενα αντιδραστήρια**

Αντιδραστήριο	Δραστικά συστατικά	Όγκος
JAK2 Mutant Control (Μάρτυρας μεταλλαγμένου τύπου JAK2)	DNA κυτταρικής σειράς με 100% αλληλόμορφο V617F	33 μl
JAK2 WT Control (Μάρτυρας JAK2 WT)	DNA κυτταρικής σειράς με 100% αλληλόμορφο άγριου τύπου	33 μl
JAK2 MT Quant Standards (Πρότυπα ποσοτικοποίησης JAK2 MT) (Πρότυπο ποσοτικοποίησης 1 έως Πρότυπο ποσοτικοποίησης 4)	Πλασμίδιο με την αλληλουχία αλληλόμορφου V617F	20 μl έκαστο
JAK2 WT Quant Standards (Πρότυπα ποσοτικοποίησης JAK2 WT) (Πρότυπο ποσοτικοποίησης 1 έως Πρότυπο ποσοτικοποίησης 4)	Πλασμίδιο με την αλληλουχία αλληλόμορφου άγριου τύπου	20 μl έκαστο
JAK2 MT Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης JAK2 MT)	Ολιγονουκλεοτίδια για την ανίχνευση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου και του εσωτερικού μάρτυρα, PCR Buffer, MgCl <sub>2</sub> , dNTP	1.010 μl
JAK2 WT Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης JAK2 WT)	Ολιγονουκλεοτίδια για την ανίχνευση του αλληλόμορφου άγριου τύπου και του εσωτερικού μάρτυρα, PCR Buffer, MgCl <sub>2</sub> , dNTP	1.010 μl
Taq DNA polymerase (Taq DNA πολυμεράση)	Taq DNA πολυμεράση θερμής εκκίνησης σε διάλυμα φύλαξης	85 μl
TE buffer for sample dilution (Ρυθμιστικό διάλυμα TE για αραιώση των δειγμάτων)	Ρυθμιστικό διάλυμα tris-EDTA	1,9 ml
Water for no template control (NTC) (Νερό για μάρτυρα χωρίς μήτρα)	Νερό χωρίς νουκλεάση	1,9 ml

## Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνονται στο κιτ, και αναγράφονται στον Πίνακα 2 παραπάνω, είναι όσα απαιτούνται για την αραίωση των δειγμάτων εξέτασης στην απαιτούμενη ποσότητα και για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων qPCR για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου και του αλληλόμορφου άγριου τύπου του *JAK2* ώστε να προσδιοριστεί το ποσοστό μετάλλαξης. Ο εσωτερικός μάρτυρας ενίσχυσης που περιλαμβάνεται στα μείγμα αντίδρασης χρησιμοποιείται για να παρακολουθεί την αναστολή της qPCR και να αποκλείει την αστοχία της αντίδρασης PCR σε περίπτωση αρνητικών αποτελεσμάτων.

## Μάρτυρες και πρότυπα

Στο κιτ περιλαμβάνονται δύο μάρτυρες: ο μάρτυρας μεταλλαγμένου τύπου *JAK2* που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου (MT) *JAK2* και ο μάρτυρας άγριου τύπου (WT) *JAK2* που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου (WT) *JAK2*. Το νερό χωρίς νουκλεάση παρέχεται ως μάρτυρας χωρίς μήτρα και για τα δύο μείγματα αντίδρασης.

Στο κιτ περιλαμβάνονται τέσσερα πρότυπα *JAK2* Mutant (MT) και τέσσερα Πρότυπα ποσοτικοποίησης (QS) άγριου τύπου (WT) *JAK2*. Χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του αριθμού αντιγράφων των *JAK2* MT και WT και, στη συνέχεια, του ποσοστού της μετάλλαξης *JAK2 V617F* των δειγμάτων εξέτασης.

# Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

## Αναλώσιμα και αντιδραστήρια για χειροκίνητη εκχύλιση DNA

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (αρ. κατ. 61104)
- Αιθανόλη (96–100%)
- **Σημείωση:** Μη χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη διότι περιέχει άλλες ουσίες όπως μεθανόλη ή μεθυλαιθυλκετόνη.

## Αναλώσιμα και αντιδραστήρια για αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA

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

## Αναλώσιμα και αντιδραστήρια για PCR

- Ανθεκτικά στα αερολύματα αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας PCR χωρίς νουκλεάση με υδρόφοβα φίλτρα
- Σωληνάρια PCR χωρίς νουκλεάση 1,5 ml ή 2,0 ml
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, για Rotor-Gene Q (αρ. κατ. 981103 ή 981106)
- Πάγος

## Εξοπλισμός

- Ρυθμιζόμενες πιπέτες\* αποκλειστικά για PCR (1–10  $\mu$ l, 10–100  $\mu$ l, 100–1.000  $\mu$ l)
- Γάντια μίας χρήσης
- Αναδευτήρας Vortex
- Θερμικό μπλοκ για τη λύση δειγμάτων στους 56 °C
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος\* με ρότορα για σωληνάρια αντίδρασης 0,5/1,5/2,0 ml (με δυνατότητα 13.000–14.000 rpm)
- Φασματοφωτόμετρο\*

## Εξοπλισμός για την παρασκευή δειγμάτων

- Όργανο QIAasymphony SP\* (αρ. κατ. 9001297), έκδοση λογισμικού 4.0 ή μεταγενέστερη, παρελκόμενα και πρωτόκολλο Blood\_200\_V7\_DSP (ή μεταγενέστερη έκδοση)
- Tube Insert 3B (Ένθετο, 2,0 ml v2, φορέας δειγμάτων) (samplecarr.) (24), Qsym, αρ. κατ. 9242083

## Εξοπλισμός για την εκτέλεση real-time PCR

- Όργανο real-time PCR\*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (αρ. κατ. 9002032) ή Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (αρ. κατ. 9002033) και παρελκόμενα
- Εγκατεστημένο λογισμικό Rotor-Gene AssayManager® έκδοσης 2.1.x ( $x \geq 0$ )
- Εγκατεστημένο Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in έκδοσης 1.0.x ( $x \geq 0$ )
- Εισηγμένο ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR Assay Profile (AP\_ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR\_V2\_0\_x.iap ( $x \geq 1$ ))

\* Πριν από τη χρήση, βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.


# Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Λάβετε υπόψη ότι ενδέχεται να χρειαστεί να ανατρέξετε στους τοπικούς κανονισμούς για την αναφορά σοβαρών συμβάντων που σχετίζονται με το προϊόν στον κατασκευαστή ή/και στον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπό του και στη ρυθμιστική αρχή στην οποία υπάγεται ο χρήστης ή/και ο ασθενής.

## Πληροφορίες ασφάλειας

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στη διεύθυνση [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), όπου μπορείτε να βρείτε, να προβάλετε και να εκτυπώσετε τα SDS για κάθε κιτ της QIAGEN, καθώς και για τα περιεχόμενά του.

- Τα δοκίμια και τα δείγματα είναι δυνητικώς μολυσματικά. Τα απόβλητα των δειγμάτων και των προσδιορισμών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες ασφαλείας.

<p><b>ΠΡΟΣΟΧΗ</b></p> 	<p>ΜΗΝ προσθέτετε λευκαντικά ή όξινα διαλύματα απευθείας στα απόβλητα παρασκευής δειγμάτων.</p>
---	---

## Πληροφορίες σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης

CHEMTREC

Εκτός ΗΠΑ και Καναδά +1 703-527-3887

## Προφυλάξεις

Η χρήση δοκιμασιών qPCR απαιτεί ορθές εργαστηριακές πρακτικές, συμπεριλαμβανομένης της συντήρησης του εξοπλισμού, οι οποίες είναι ειδικές για τη μοριακή βιολογία. Η χρήση πρέπει επίσης να συμμορφώνεται με τους ισχύοντες κανονισμούς και τα σχετικά πρότυπα.

Αυτό το kit προορίζεται για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Τα αντιδραστήρια και οι οδηγίες που παρέχονται με το kit αυτό έχουν επικυρωθεί για βέλτιστη απόδοση.

- Η εξέταση προορίζεται για χρήση με δείγματα ολικού αίματος που περιέχουν ως αντιπηκτικό καλιούχο EDTA (K<sub>2</sub>-EDTA) και φυλάσσονται σε 2–8 °C το ανώτατο για 96 ώρες μέχρι την εκχύλιση DNA.
- Όλες οι χημικές ουσίες και τα βιολογικά υλικά είναι εν δυνάμει επικίνδυνα. Τα δοκίμια και τα δείγματα είναι εν δυνάμει μολυσματικά και πρέπει να αντιμετωπίζονται ως βιολογικά επικίνδυνα υλικά.
- Τα απόβλητα των δειγμάτων και των προσδιορισμών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες ασφαλείας.
- Τα αντιδραστήρια του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit βρίσκονται στην ιδανική αραίωση. Μην εκτελείτε περαιτέρω αραίωση των αντιδραστηρίων, καθώς ενδέχεται να προκληθεί υποβάθμιση των επιδόσεων.
- Μη χρησιμοποιείτε όγκους αντίδρασης (μείγμα αντίδρασης συν δείγμα) μικρότερους από 25 μl.
- Όλα τα αντιδραστήρια που παρέχονται στο *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit προορίζονται για χρήση αποκλειστικά με τα άλλα αντιδραστήρια που παρέχονται στο ίδιο kit. Μην αντικαθιστάτε ένα αντιδραστήριο από ένα kit με το ίδιο αντιδραστήριο άλλου *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, ακόμη και από την ίδια παρτίδα, καθώς κάτι τέτοιο ενδέχεται να επηρεάσει την απόδοση.
- Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, στο εγχειρίδιο χρήσης της εφαρμογής Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application, στο εγχειρίδιο χρήσης του Gamma Plug-In και στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου QIASymphony SP για επιπλέον προειδοποιήσεις, προφυλάξεις και διαδικασίες.

- Η τροποποίηση των χρόνων και των θερμοκρασιών επώασης μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα ή ασυνεπή δεδομένα.
- Μη χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.
- Τα μείγματα αντίδρασης μπορεί να αλλοιωθούν εάν εκτεθούν στο φως.
- Προσέξτε ιδιαίτερα ώστε να αποφύγετε τη μόλυνση των μειγμάτων με τα συνθετικά υλικά που περιέχονται στα αντιδραστήρια JAK2 MT και JAK2 WT Quant Standards και τα αντιδραστήρια JAK2 Mutant και JAK2 WT Control.
- Προσέξτε ιδιαίτερα ώστε να αποφύγετε την επιμόλυνση λόγω μεταφοράς DNA ή προϊόντος PCR που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικό σήμα.
- Προσέξτε ιδιαίτερα ώστε να αποφύγετε τη μόλυνση από DNάση που μπορεί να προκαλέσει υποβάθμιση της μήτρας DNA.
- Χρησιμοποιείτε μεμονωμένες, ειδικές πιπέτες για την προετοιμασία των μειγμάτων αντίδρασης και την προσθήκη της μήτρας.
- Μην ανοίγετε το όργανο Rotor-Gene Q MDx πριν ολοκληρωθεί η εκτέλεση ανάλυσης.
- Μην ανοίγετε τα σωληνάρια Rotor-Gene Q αφού ολοκληρωθεί η εκτέλεση ανάλυσης.
- Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να διασφαλιστεί η σωστή εξέταση των δειγμάτων με έμφαση στην αποφυγή εσφαλμένης εισαγωγής δείγματος και τυχόν σφαλμάτων φόρτωσης και διοχέτευσης με πιπέτα.
- Βεβαιωθείτε ότι ο χειρισμός των δειγμάτων γίνεται με συστηματικό τρόπο ώστε να διασφαλίζεται διαρκώς η σωστή ταυτοποίηση και ιχνηλασιμότητα.
- Κατά συνέπεια, συνιστούμε τα εξής:
  - Χρησιμοποιείτε εργαστηριακό εξοπλισμό (π.χ. πιπέτες, ρύγχη πιπέτας, φιαλίδια αντίδρασης) χωρίς νουκλεάση και φοράτε γάντια όταν εκτελείτε τον προσδιορισμό.
  - Χρησιμοποιείτε νέα ανθεκτικά στα αερολύματα ρύγχη πιπέτων για όλα τα βήματα διανομής με πιπέτα προκειμένου να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.



- Παρασκευάζετε το κύριο μείγμα προ της PCR χρησιμοποιώντας ειδικό εξοπλισμό (πιπέτες, ρύγχη κ.λπ.) σε αποκλειστικό χώρο όπου δεν εισέρχεται καθόλου μήτρα DNA (DNA, πλασμίδια ή προϊόντα PCR). Προσθέτετε τη μήτρα σε χωριστή ζώνη (κατά προτίμηση σε χωριστό δωμάτιο) χρησιμοποιώντας ειδικό εξοπλισμό (πιπέτες, ρύγχη κ.λπ.).

Για πληροφορίες ασφάλειας σχετικά με τα κιτ εκχύλισης QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (αρ. κατ. 61104) και QIASymphony DSP DNA Mini Kit (αρ. κατ. 937236) ανατρέξτε στα αντίστοιχα εγχειρίδια.

# Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Πρέπει να δίδεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.

## Συνθήκες μεταφοράς

Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit αποστέλλεται σε ξηρό πάγο. Εάν οποιοδήποτε συστατικό του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (εκτός από το ένζυμο) δεν είναι κατεψυγμένο κατά την παραλαβή, η εξωτερική συσκευασία έχει ανοίξει κατά τη μεταφορά ή στο κιβώτιο αποστολής δεν περιλαμβάνονται το δελτίο συσκευασίας, το εγχειρίδιο ή τα αντιδραστήρια, επικοινωνήστε με κάποιο από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (ανατρέξτε στο οπισθόφυλλο ή επισκεφτείτε τη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Συνθήκες αποθήκευσης

Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit πρέπει να αποθηκεύεται αμέσως μετά την παραλαβή σε θερμοκρασία -30 °C έως -15 °C σε καταψύκτη σταθερής θερμοκρασίας, σε σκοτεινό χώρο.

Για πληροφορίες σχετικά με την αποθήκευση και τα κιτ εκχύλισης QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (αρ. κατ. 61104) και QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (αρ. κατ. 937236) ανατρέξτε στα αντίστοιχα εγχειρίδια.

## Σταθερότητα κατά τη χρήση

Όταν φυλάσσεται υπό τις καθορισμένες συνθήκες αποθήκευσης, το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit είναι σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα της συσκευασίας.

Μετά το άνοιγμα, τα αντιδραστήρια μπορούν να αποθηκευτούν στην αρχική τους συσκευασία σε θερμοκρασία  $-30$  έως  $-15$  °C για 12 μήνες. Η επανειλημμένη απόψυξη και κατάψυξη θα πρέπει να αποφεύγεται. Μην υπερβαίνετε το μέγιστο όριο πέντε κύκλων κατάψυξης-απόψυξης.

Για πληροφορίες σχετικά με τη σταθερότητα και τα κιτ εκχύλισης QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (αρ. κατ. 61104) και QIASymphony DSP DNA Mini Kit (αρ. κατ. 937236) ανατρέξτε στα αντίστοιχα εγχειρίδια.

- Αναμείξτε ελαφρώς αναστρέφοντας 10 φορές το σωληνάριο και εκτελέστε φυγοκέντριση όλων των σωληναρίων, εκτός από το ένζυμο, πριν από το άνοιγμα.
- Οι ημερομηνίες λήξης για κάθε αντιδραστήριο υποδεικνύονται στις ετικέτες των επιμέρους συστατικών. Σε σωστές συνθήκες φύλαξης, το προϊόν θα διατηρήσει την απόδοσή του ως προς τον υποδεικνυόμενο χρόνο σταθερότητας που αναγράφεται στην ετικέτα του σωληναρίου και της συσκευασίας.
- **Σημείωση:** Μην αναμειγνύετε σωληνάρια από διαφορετικές παρτίδες. Όλα τα συστατικά του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit που χρησιμοποιούνται σε μια δοκιμασία πρέπει να προέρχονται από την ίδια παρτίδα. Οι διαδικασίες ελέγχου ποιότητας στην QIAGEN περιλαμβάνουν δοκιμασίες λειτουργίας των κιτ για κάθε επιμέρους παρτίδα του κιτ. Συνεπώς, μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικά κιτ, ακόμη και εάν προέρχονται από την ίδια παρτίδα.

# Φύλαξη και χειρισμός δοκιμίων

## Δείγματα ολικού αίματος

Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit προορίζεται για χρήση με δείγματα γονιδιωματικού DNA κατόπιν εκχύλισης δειγμάτων ολικού αίματος που περιέχουν ως αντιπηκτικό καλιούχο EDTA (K<sub>2</sub>-EDTA) και φυλάσσονται με έναν από τις εξής τρόπους:

- Σε θερμοκρασία 2–8 °C το ανώτατο για 96 ώρες.
- Σε θερμοκρασία 15–25 °C το ανώτατο για 96 ώρες.
- Κατεψυγμένα σε θερμοκρασία –30 έως –15 °C το ανώτατο για 1 μήνα.

**Σημείωση:** Πρέπει να αποφεύγονται οι μεταβολές στη θερμοκρασία αποθήκευσης μεταξύ του σημείου συλλογής και του χώρου μεταφοράς. Οι συνθήκες αποθήκευσης στο κέντρο δοκιμασίας πρέπει να είναι ίδιες με του χώρου μεταφοράς ή χαμηλότερης θερμοκρασίας.

Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μολυσματικά. Τα απόβλητα των δειγμάτων και των προσδιορισμών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες ασφαλείας.

## Δείγματα γονιδιωματικού DNA

Μετά από την εκχύλιση του γονιδιωματικού DNA, τα δείγματα DNA μπορούν να αποθηκευτούν και να αποσταλούν σε θερμοκρασία –30 έως –15 °C το ανώτατο για 24 μήνες. Αποφεύγετε τους πολλούς κύκλους κατάψυξης-απόψυξης. Μην υπερβαίνετε το μέγιστο όριο των τεσσάρων κύκλων κατάψυξης-απόψυξης.

# Πρωτόκολλο: Εκχύλιση γονιδιωματικού DNA και παρασκευή από ολικό αίμα

## Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Το γονιδιωματικό DNA πρέπει να εκχυλίζεται με χρήση του QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (αρ. κατ. 61104) ή του οργάνου QIASymphony SP σε συνδυασμό με το QIASymphony DSP DNA Mini Kit (αρ. κατ. 937236).
- Διασφαλίστε ότι τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται δεν έχουν λήξει και έχουν μεταφερθεί και αποθηκευτεί σε σωστές συνθήκες.
- **Σημείωση:** Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit έχει επικυρωθεί μόνο σε συνδυασμό με το QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (αρ. κατ. 61104) ή το QIASymphony DSP DNA Mini Kit (αρ. κατ. 937236). Μη χρησιμοποιείτε κανένα άλλο προϊόν εκχύλισης DNA.

## Χειροκίνητη εκχύλιση γονιδιωματικού DNA με χρήση του QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Η χειροκίνητη εκχύλιση γονιδιωματικού DNA πρέπει να εκτελείται με το QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (αρ. κατ. 61104) σύμφωνα με το αντίστοιχο εγχειρίδιο *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit*.

## Χειρισμός των αντιδραστηρίων

- Κατά την παρασκευή του Ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης στο παρόν πρωτόκολλο, αναμειγνύετε πάντα το ανασυσταμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης αναστρέφοντας τη φιάλη αρκετές φορές πριν από την έναρξη της διαδικασίας.
- Χρησιμοποιείτε ρύγχη πιπέτας με φραγμό αερολυμάτων κατά τη διανομή του Ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης από τη φιάλη και επανατοποθετείτε αμέσως το πώμα για να αποφύγετε την επιμόλυνση.

- Κατά τον χειρισμό υγρών υψηλού ιξώδους απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή και χρήση κατάλληλης πιπέτας για να διασφαλίζονται οι σωστοί όγκοι κατά τη διανομή.
- Αποφεύγετε να αγγίζετε τη μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού QIAamp Mini με το ρύγχος της πιπέτας.



- Μην προσθέτετε QIAGEN Protease (QP) απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (AL).

### Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Αφήστε τα δείγματα αίματος να ισοροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) και βεβαιωθείτε ότι έχουν ομογενοποιηθεί καλά.
- Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης  
Εάν έχει δημιουργηθεί καθίζημα στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (AL), διαλύστε το μέσω επώασης στους 56 °C.
- Παρασκευή του QIAGEN Protease  
Προσθέστε 1,2 ml Protease Solvent (PS) στο φιαλίδιο του λυοφιλοποιημένου QIAGEN Protease (QP) και αναμείξτε προσεκτικά. Για να αποφύγετε τον αφρισμό, αναδεύστε αναποδογυρίζοντας αρκετές φορές το φιαλίδιο. Βεβαιωθείτε πως η QIAGEN Protease (QP) έχει διαλυθεί πλήρως.

**Σημείωση:** Μην προσθέτετε QP απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (AL).

- Παρασκευή του Ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1  
Χρησιμοποιώντας έναν ογκομετρικό κύλινδρο, προσθέστε 25 ml αιθανόλης (96–100%) στη φιάλη που περιέχει 19 ml συμπυκνωμένου Ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 (AW1). Φυλάσσετε το ανασυσταμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1 (AW1) σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C).  
**Σημείωση:** Αναμειγνύετε πάντα το ανασυσταμένο Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (AW1) αναστρέφοντας τη φιάλη αρκετές φορές πριν από την έναρξη της διαδικασίας.
- Παρασκευή του Ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2  
Χρησιμοποιώντας έναν ογκομετρικό κύλινδρο, προσθέστε 30 ml αιθανόλης (96–100%) στη φιάλη που περιέχει 13 ml συμπυκνωμένου Ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 (AW2).

Φυλάσσετε το ανασυσταμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (AW2) σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C).

**Σημείωση:** Αναμειγνύετε πάντα το ανασυσταμένο Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (AW2) αναστρέφοντας τη φιάλη αρκετές φορές πριν από την έναρξη της διαδικασίας.

- Παρασκευή του Ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης  
Με το κιτ παρέχεται μία φιάλη Ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (AE). Για την αποτροπή μόλυνσης του Ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (AE), συνιστούμε ιδιαίτερα τη χρήση ρυγών πιπέτας με φραγμό αερολυμάτων κατά την αναρρόφηση του Ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (AE) από τη φιάλη και την επανατοποθέτηση του πώματος της φιάλης αμέσως μετά.
- Αφήστε το Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (AE) να ισορροπήσει σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C).
- Ρυθμίστε ένα θερμικό μπλοκ σε θερμοκρασία 56 °C για χρήση στο βήμα 4 της διαδικασίας.

## Διαδικασία

1. Μεταφέρετε με πιπέτα 20 μl QIAGEN Protease (QP) σε ένα σωληνάριο λύσης (Lysis Tube, LT).

**Σημείωση:** Ελέγξτε την ημερομηνία λήξης της ανασυσταμένης πρωτεάσης πριν από τη χρήση.

2. Προσθέστε 200 μl δείγματος αίματος στο σωληνάριο λύσης (Lysis Tube, LT).
3. Προσθέστε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (AL) στο σωληνάριο λύσης (Lysis Tube, LT), κλείστε το καπάκι και αναμείξτε με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα vortex για 15 δευτερόλεπτα.

**Σημείωση:** Για τη διασφάλιση της λύσης είναι απαραίτητη η καλή ανάμιξη του δείγματος και του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (AL) ώστε να προκύψει ένα ομοιογενές διάλυμα.

**Σημείωση:** Επειδή το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (AL) έχει υψηλό ιξώδες, διασφαλίστε ότι προσθέτετε τον σωστό όγκο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (AL) με προσεκτική διανομή και χρήση κατάλληλης πιπέτας.



Μην προσθέτετε QIAGEN Protease (QP) απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (AL).

4. Επωάστε στους 56 °C ( $\pm 1$  °C) για 10 λεπτά ( $\pm 1$  λεπτό).
5. Φυγοκεντρίστε το σωληνάριο λύσης (Lysis Tube, LT) για περίπου 5 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα για να απομακρύνετε τυχόν σταγονίδια από την εσωτερική πλευρά του καπακιού.
6. Προσθέστε 200 μl αιθανόλης (96–100%) στο σωληνάριο λύσης (Lysis Tube, LT), κλείστε το καπάκι και αναμειξτε καλά με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα vortex για  $\geq 15$  δευτερόλεπτα.
7. Φυγοκεντρίστε το σωληνάριο λύσης (Lysis Tube, LT) για  $\geq 5$  δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα για να απομακρύνετε τυχόν σταγονίδια από την εσωτερική πλευρά του καπακιού.
8. Προσθέστε προσεκτικά ολόκληρη την ποσότητα του κυτταρολύματος από το βήμα 7 στη στήλη διαχωρισμού QIAamp Mini χωρίς να βρέξετε το χείλος. Αποφεύγετε να αγγίζετε τη μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού QIAamp Mini με το ρύγχος της πιπέτας.

**Σημείωση:** Εάν επεξεργάζεστε πολλά δείγματα, ανοίγετε μόνο ένα σωληνάριο λύσης (Lysis Tube, LT) κάθε φορά.

9. Κλείστε το καπάκι της στήλης διαχωρισμού QIAamp Mini και φυγοκεντρίστε με περίπου 6.000 x g για 1 λεπτό. Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού QIAamp Mini σε ένα καθαρό σωληνάριο πλύσης (Wash Tube, WT) και απορρίψτε το σωληνάριο που περιέχει το διήθημα.


**Σημείωση:** Εάν το κυτταρόλυμα δεν έχει περάσει πλήρως μέσα από τη μεμβράνη μετά από φυγοκέντριση σε 6.000 x g (8.000 rpm), φυγοκεντρίστε το ξανά στη μέγιστη ταχύτητα (έως 20.800 x g) για 1 λεπτό.



**Σημείωση:** Εάν το κυτταρόλυμα εξακολουθεί να μην περνά μέσα από τη μεμβράνη κατά τη φυγοκέντρωση, απορρίψτε το δείγμα και επαναλάβετε την απομόνωση και τον καθαρισμό με νέο υλικό δείγματος.

10. Ανοίξτε προσεκτικά τη στήλη διαχωρισμού QIAamp Mini και προσθέστε 500 μl Ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 (AW1) χωρίς να βρέξετε το χείλος. Αποφεύγετε να αγγίζετε τη μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού QIAamp Mini με το ρύγχος της πιπέτας.
11. Κλείστε το καπάκι της στήλης διαχωρισμού QIAamp Mini και φυγοκεντρίστε με περίπου 6.000 x g (8.000 rpm) για 1 λεπτό. Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού QIAamp Mini σε ένα καθαρό σωληνάριο πλύσης (Wash Tube, WT) και απορρίψτε το σωληνάριο που περιέχει το διήθημα.
12. Ανοίξτε προσεκτικά τη στήλη διαχωρισμού QIAamp Mini και προσθέστε 500 μl Ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 (AW2) χωρίς να βρέξετε το χείλος. Αποφεύγετε να αγγίζετε τη μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού QIAamp Mini με το ρύγχος της πιπέτας.
13. Κλείστε το καπάκι της στήλης διαχωρισμού QIAamp Mini και φυγοκεντρίστε στη μέγιστη ταχύτητα (περίπου 20.000 x g ή 14.000 rpm) για 1 λεπτό. Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού QIAamp Mini σε ένα καθαρό σωληνάριο πλύσης (Wash Tube, WT) και απορρίψτε το σωληνάριο που περιέχει το διήθημα.
14. Φυγοκεντρίστε στη μέγιστη ταχύτητα (περίπου 20.000 x g ή 14.000 rpm) για 3 λεπτά ώστε η μεμβράνη να στεγνώσει τελείως.
15. Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού QIAamp Mini σε ένα καθαρό σωληνάριο έκλουσης (Elution Tube, ET) και απορρίψτε το σωληνάριο πλύσης (Wash Tube, WT) που περιέχει το διήθημα. Ανοίξτε προσεκτικά το καπάκι της στήλης διαχωρισμού QIAamp Mini και προσθέστε 50–200 μl Ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (AE) στο κέντρο της μεμβράνης. Κλείστε το καπάκι και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) για 1 λεπτό. Φυγοκεντρίστε με περίπου 6.000 x g (8.000 rpm) για 1 λεπτό για την έκλυση του DNA.
16. Απορρίψτε τα χρησιμοποιημένα σωληνάρια δειγμάτων, τις πλάκες και τα απόβλητα σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.

## Αυτοματοποιημένη εκχύλιση γονιδιωματικού DNA με χρήση του QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Η αυτοματοποιημένη εκχύλιση γονιδιωματικού DNA πρέπει να εκτελείται με το όργανο QIASymphony, με χρήση της μονάδας Sample Preparation (SP) σε συνδυασμό με το QIASymphony DSP DNA Mini Kit (αρ. κατ. 937236) και σύμφωνα με τις οδηγίες στο εγχειρίδιο *QIASymphony DSP DNA Kit*. Τα στάδια του πρωτοκόλλου που αφορούν ειδικά τη χρήση του *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* επισημαίνονται στην ακόλουθη διαδικασία με το σύμβολο .

Με το QIASymphony SP, το QIASymphony DSP DNA Mini Kit επιτρέπει τον αυτοματοποιημένο καθαρισμό του DNA από ανθρώπινο ολικό αίμα (με χρήση του πρωτοκόλλου Blood\_200\_V7\_DSP (ή μεταγενέστερης έκδοσης) στο QIASymphony SP).

- Δεν απαιτείται προκαταρκτική επεξεργασία.
- Τα σωληνάρια μεταφέρονται απευθείας στο QIASymphony SP.
- Ο καθαρισμός DNA εκτελείται με μαγνητικά σωματίδια.

### Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση



- Ο όγκος ολικού αίματος που εκχυλίζεται είναι 300 μl.

### Προετοιμασία

- Βεβαιωθείτε πως έχετε εξοικειωθεί με τη λειτουργία του QIASymphony SP. Για τις οδηγίες που αφορούν τη λειτουργία, ανατρέξτε στα εγχειρίδια χρήσης που συνοδεύουν το όργανο.

## Χειρισμός των αντιδραστηρίων

- Προτού χρησιμοποιήσετε μια φύσιγγα αντιδραστηρίων για πρώτη φορά, βεβαιωθείτε πως τα Buffer QSL1 και Buffer QSB1 δεν περιέχουν ίζημα. Εάν είναι απαραίτητο, αφαιρέστε τα λεκανίδια που περιέχουν Buffer QSL1 και Buffer QSB1 από τη φύσιγγα αντιδραστηρίων και επωάστε για 30 λεπτά στους 37 °C με περιστασιακή ανακίνηση για τη διάλυση του ιζήματος. Μην παραλείψετε να επιστρέψετε τα λεκανίδια στις σωστές θέσεις. Εάν η φύσιγγα αντιδραστηρίων έχει ήδη διατηρηθεί, βεβαιωθείτε πως τα λεκανίδια έχουν σφραγιστεί με Ταινίες σφράγισης για επαναληπτική χρήση και επωάστε ολόκληρη τη φύσιγγα αντιδραστηρίων για 30 λεπτά στους 37 °C με περιστασιακή ανακίνηση σε λουτρό νερού.
- Προσπαθήστε να αποφύγετε την έντονη ανακίνηση της φύσιγγας αντιδραστηρίων (Reagent Cartridge, RC), διότι ενδέχεται να σχηματιστεί αφρός, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα ανίχνευσης της στάθμης υγρού.

## Συντήρηση

- Η προαιρετική συντήρηση του QIASymphony SP δεν είναι υποχρεωτική, συνιστάται ωστόσο επισταμένως για τη μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης.

## Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Πριν από την έναρξη της διαδικασίας, διασφαλίστε ότι τα μαγνητικά σωματίδια έχουν πλήρως επανεναιωρηθεί. Στροβιλίστε δυνατά σε αναδευτήρα vortex το λεκανίδιο που περιέχει τα μαγνητικά σωματίδια για 3 λεπτά τουλάχιστον πριν από την πρώτη χρήση.
- Διασφαλίστε ότι το κάλυμμα διάτηρησης έχει τοποθετηθεί επάνω στη φύσιγγα αντιδραστηρίων και ότι το κάλυμμα του λεκανιδίου μαγνητικών σωματιδίων έχει αφαιρεθεί ή, εάν χρησιμοποιείτε μια μερικώς χρησιμοποιημένη φύσιγγα αντιδραστηρίων, διασφαλίστε ότι έχουν απομακρυνθεί οι Ταινίες σφράγισης για επαναληπτική χρήση.
- Βεβαιωθείτε ότι έχετε ανοίξει τα σωληνάκια ενζύμων.

- Εάν τα δείγματα φέρουν γραμμωτό κώδικα, προσανατολίστε τα δείγματα στο φορέα σωληναρίων με τρόπο που ο γραμμωτός κώδικας να είναι στραμμένος προς τον αναγνώστη γραμμωτού κώδικα στην αριστερή πλευρά του QIASymphony SP.

## Διαδικασία

1. Κλείστε όλα τα συρτάρια και το κάλυμμα.
2. Ενεργοποιήστε το QIASymphony SP και περιμένετε έως ότου εμφανιστεί η οθόνη «Sample Preparation» (Παρασκευή δειγμάτων) και ολοκληρωθεί η διαδικασία αρχικοποίησης.

**Σημείωση:** Ο κεντρικός διακόπτης βρίσκεται στην αριστερή κάτω γωνία του QIASymphony SP.

3. Συνδεθείτε στο όργανο.
4. Διασφαλίστε ότι έχει προετοιμαστεί σωστά το συρτάρι «Waste» (Απόβλητα) και διενεργήστε σάρωση υλικού του συρταριού «Waste» (Απόβλητα), συμπεριλαμβανομένου του κεκλιμένου αγωγού ρυγχών και του δοχείου υγρών αποβλήτων. Εάν χρειάζεται, αντικαταστήστε τη σακούλα απόρριψης ρυγχών.
5. Φορτώστε την απαιτούμενη θήκη έκλουσης στο συρτάρι «Eluate» (Έκλουσμα).

**Σημαντικό:** Μην φορτώσετε πλάκα 96 βυθισμάτων στην υποδοχή «Elution slot 4» (Υποδοχή έκλουσης 4).

Χρησιμοποιείτε μόνο το «Elution slot 1» (Υποδοχή έκλουσης 1) με τον αντίστοιχο προσαρμογέα ψύξης.

**Σημείωση:** Κατά τη χρήση πλάκας 96 βυθισμάτων διασφαλίστε πως η πλάκα έχει προσανατολιστεί σωστά. Η λανθασμένη τοποθέτηση μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη διάταξη των δειγμάτων κατά την καθοδική ανάλυση.

6. Φορτώστε την απαιτούμενη φύσιγγα (ή τις φύσιγγες) αντιδραστηρίων και τα αναλώσιμα στο συρτάρι «Reagents and Consumables» (Αντιδραστήρια και αναλώσιμα).

**Σημείωση:** Διασφαλίστε ότι τα ρύγχη διανομής με πιπέτα έχουν τοποθετηθεί σωστά.

7. Εκτελέστε σάρωση υλικού του συρταριού «Reagents and Consumables» (Αντιδραστήρια και αναλώσιμα).



8. Μεταφέρετε **300 μl** από το δείγμα ολικού αίματος που θα εκχυλιστεί σε Micro Tube (2.0 ml Type H) χωρίς νουκλεάση και τοποθετήστε το σωληνάριο στον προσαρμογέα 3b 2 ml στον φορέα σωληναρίων. Φορτώστε τα σωληνάρια δειγμάτων στο συρτάρι «Sample» (Δείγμα).

9. Από την οθόνη αφής καταχωρίστε τις απαιτούμενες πληροφορίες για κάθε παρτίδα δειγμάτων που πρόκειται να υποβληθεί σε επεξεργασία:

- **Πληροφορίες δείγματος:** Αλλάξτε τον προεπιλεγμένο τύπο σωληναρίου. Για να το κάνετε, επιλέξτε «Select All» (Επιλογή όλων). Στη συνέχεια, επιλέξτε «Sarstedt reference 72.694» (Κωδικός Sarstedt 72.694) από το φύλλο «Tube Insert» (Ένθετο σωληναρίου).
- **Πρωτόκολλο προς εκτέλεση:** Επιλέξτε Select All (Επιλογή όλων). Στη συνέχεια, στην κατηγορία, επιλέξτε DNA Blood > Blood\_200\_V7\_DSP (ή μεταγενέστερη έκδοση) για το δείγμα ολικού αίματος.



- **Όγκος έκλουσης και θέση εξόδου:** 100 μl για το πρωτόκολλο ολικού αίματος.

**Σημείωση:** Μετά την καταχώριση των πληροφοριών για την παρτίδα, η κατάσταση αλλάζει από LOADED (Φορτώθηκε) σε QUEUED (Σε σειρά αναμονής). Μόλις μια παρτίδα τεθεί σε ουρά αναμονής, εμφανίζεται το κουμπί **Run** (Εκτέλεση).

10. Ξεκινήστε την εκτέλεση.

10a. Για να ξεκινήσετε την εκτέλεση, κάντε κλικ στο **Run** (Εκτέλεση).

10b. Διαβάστε και επιβεβαιώστε το μήνυμα που εμφανίζεται.

**Σημείωση:** Συνιστάται να περιμένετε δίπλα στο όργανο μέχρι να ολοκληρωθεί η ανίχνευση στάθμης υγρού των σωληναρίων εσωτερικού μάρτυρα και να αλλάξει η κατάσταση φορέα του QIASymphony SP σε **RUNNING** (Εκτελείται).

**Σημαντικό:** Μην κάνετε παύση ή διακοπή της εκτέλεσης στη διάρκεια της επεξεργασίας (εκτός από περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης), καθώς αυτή η ενέργεια θα επισημάνει τα δείγματα με την ένδειξη «unclear» (ακαθόριστα).

**Σημείωση:** Υπάρχει δυνατότητα συνεχούς φόρτωσης δειγμάτων και προσθήκης στην εκτέλεση (μέχρι να φορτωθούν τα αντιδραστήρια).

11. Πατήστε **Run** (Εκτέλεση) για να ξεκινήσει η διαδικασία καθαρισμού.
12. Μόλις ολοκληρωθεί η εκτέλεση του πρωτοκόλλου, η κατάσταση της παρτίδας αλλάζει από **RUNNING** (Εκτελείται) σε **COMPLETED** (Ολοκληρώθηκε). Εξάγετε τη θήκη έκλουσης που περιέχει τα καθαρά νουκλεϊκά οξέα από το συρτάρι «Eluate» (Εκλουσμα).

Συνιστούμε την αφαίρεση της πλάκας εκλούσματος από το συρτάρι «Eluate» (Εκλουσμα) αμέσως μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης. Ανάλογα με τη θερμοκρασία και την υγρασία, οι πλάκες έκλουσης που παραμένουν στο QIASymphony SP μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης ενδέχεται να υποστούν συμπίκνωση ή εξάτμιση.

**Σημείωση:** Τα μαγνητικά σωματίδια δεν μεταφέρονται γενικά στα εκλούσματα. Αν κάποιο έκλουσμα περιέχει μαύρα σωματίδια, τα μαγνητικά σωματίδια μπορούν να απομακρυνθούν ως εξής:

- 12a. Τοποθετήστε το σωληνάριο που περιέχει το DNA σε έναν κατάλληλο μαγνητικό διαχωριστή (π.χ., QIAGEN 12-Tube Magnet αρ. κατ. 36912) μέχρι να διαχωριστούν τα μαγνητικά σωματίδια.
  - 12b. Αν το DNA βρίσκεται σε μικροπλάκες, τοποθετήστε τη μικροπλάκα σε έναν κατάλληλο μαγνητικό διαχωριστή (π.χ., QIAGEN 96-Well Magnet Type A, αρ. κατ. 36915) μέχρι να διαχωριστούν τα μαγνητικά σωματίδια. Αν δεν υπάρχει διαθέσιμος κατάλληλος μαγνητικός διαχωριστής, φυγοκεντρίστε το σωληνάριο που περιέχει το DNA για 1 λεπτό σε πλήρη ταχύτητα σε μικροφυγόκεντρο για να δημιουργήσετε ίζημα από τυχόν υπολειπόμενα μαγνητικά σωματίδια.
13. Εξαγάγετε το αρχείο αποτελεσμάτων του QIASymphony SP: δημιουργείται αναφορά για κάθε πλάκα έκλουσης.
    - 13a. Εισαγάγετε τη μονάδα μνήμης USB σε μία από τις θύρες USB που βρίσκονται στο μπροστινό μέρος του QIASymphony SP.

- 13b. Κάντε κλικ στο **Tools** (Εργαλεία).
- 13c. Επιλέξτε **File Transfer** (Μεταφορά αρχείου).
- 13d. Στην καρτέλα In-/Output Files (Αρχεία εισόδου/εξόδου), επιλέξτε **Results Files** (Αρχείο αποτελεσμάτων) > **Transfer** (Μεταφορά).  
Το όνομα του αρχείου εξαγωγής πρέπει να έχει την ακόλουθη μορφή:  
**εεεε-μμ-ηηωω:λλ:δδ\_αναγνωριστικό θήκης έκλουσης**
14. Ελέγξτε τη στήλη «Validity of result» (Εγκυρότητα αποτελέσματος) για κάθε δείγμα του αρχείου αποτελεσμάτων του QIAsymphony SP.
- **Κατάσταση Valid (Έγκυρο) και Unclear (Ακαθόριστο):** Συνεχίστε στην ενότητα «Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA».
  - **Κατάσταση Invalid (Μη έγκυρο):** Το δείγμα απορρίπτεται. Επαναλάβετε το βήμα εκχύλισης.
15. Εάν μια φύσιγγα αντιδραστηρίων έχει χρησιμοποιηθεί μόνο μερικώς, σφραγίστε την με τις παρεχόμενες Ταινίες σφράγισης για επαναληπτική χρήση και κλείστε τα σωληνάρια που περιέχουν πρωτεΐνάση K με βιδωτά καπάκια, αμέσως μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης του πρωτοκόλλου για να αποφύγετε την εξάτμιση.
16. Απορρίψτε τα χρησιμοποιημένα σωληνάρια δειγμάτων, τις πλάκες και τα απόβλητα σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.
17. Καθαρίστε το QIAsymphony SP.  
Ακολουθήστε τις οδηγίες συντήρησης των οδηγιών χρήσης που συνοδεύουν το όργανο. Τα προστατευτικά ρυγχών πρέπει να καθαρίζονται τακτικά για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου διασταυρούμενης μόλυνσης.
18. Κλείστε τα συρτάρια του οργάνου και απενεργοποιήστε το QIAsymphony SP.

## Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Για τη βαθμονόμηση του φασματοφωτόμετρου θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα τυφλό ρυθμιστικού διαλύματος ATE ή AE. Η χρήση αυτών των ρυθμιστικών διαλυμάτων είναι απαραίτητη επειδή τα ρυθμιστικά διαλύματα έκλουσης που χρησιμοποιούνται στα κιτ εκχύλισης γονιδιωματικού DNA περιέχουν το συντηρητικό αζίδιο του νατρίου, το οποίο παρουσιάζει απορρόφηση στα 260 nm.

- Η αναλογία  $A_{260}/A_{280}$  πρέπει να είναι  $\geq 1,7$  καθώς οι μικρότερες αναλογίες είναι συνήθως ενδεικτικές επιμολύνσεων με πρωτεΐνη ή παρουσίας οργανικών χημικών ουσιών και επηρεάζουν το στάδιο της PCR.
- Η ποσότητα του DNA προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm.
- Συνολική ποσότητα καθαρού DNA = συγκέντρωση x όγκος δείγματος σε ml.
- Αν η αναλογία  $A_{260}/A_{280}$  είναι κάτω από 1,7 ή/και αν η συγκέντρωση γονιδιωματικού DNA είναι κάτω από 10 ng/μl, δεν πρέπει να συνεχιστεί η επεξεργασία του δείγματος.

## Κανονικοποίηση δείγματος γονιδιωματικού DNA

Το DNA πρέπει να αραιωθεί σε επίπεδο 10ng/μl με το ρυθμιστικό διάλυμα TE που περιλαμβάνεται στο *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Κάθε αντίδραση PCR στο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM βελτιστοποιείται για 50 ng καθαρού γονιδιωματικού DNA αραιωμένου σε όγκο τελικού δείγματος 5 μl. Απαιτείται σύνολο 100 ng ανά εξεταζόμενο δείγμα για την εκτέλεση των αντιδράσεων μεταλλαγμένου και άγριου τύπου.



# Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

## Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit πρέπει να εκτελείται στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM με χρήση του Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit χρειάζεται συγκεκριμένα το Gamma Plug-in. Πρόκειται για ένα πρόσθετο που μπορείτε να προμηθευτείτε με λήψη από τον ιστότοπο της QIAGEN: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Το πρόσθετο πρέπει να εγκατασταθεί στον υπολογιστή στον οποίο είναι ήδη εγκατεστημένο το Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit χρειάζεται επίσης προφίλ προσδιορισμού. Αυτό το προφίλ προσδιορισμού (αρχείο **.iap**) περιλαμβάνει όλες τις παραμέτρους που χρειάζονται για την κυκλοποίηση και την ανάλυση του προσδιορισμού qPCR. Μπορείτε να πραγματοποιήσετε λήψη από την ιστοσελίδα του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit στον ιστότοπο της QIAGEN: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Πρέπει να εισαγάγετε το προφίλ προσδιορισμού στο λογισμικό Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το όργανο Rotor-Gene Q MDx πριν προχωρήσετε στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου. Ανατρέξτε στα εγχειρίδια χρήστη του οργάνου, του Rotor-Gene AssayManager v2.1 και του Gamma Plug-in για περισσότερες λεπτομέρειες.
- Το Rotor-Gene AssayManager v2.1 ενεργοποιεί την αυτόματη ερμηνεία των αποτελεσμάτων PCR. Οι παράμετροι κυκλοποίησης της εκτέλεσης είναι κλειδωμένες.

## Προετοιμασία

- Πραγματοποιήστε λήψη και εγκατάσταση του Rotor-Gene AssayManager v2.1. Βλ. «Εγκατάσταση του λογισμικού πυρήνα Rotor-Gene AssayManager v2.1», σελ. 42 για λεπτομερείς πληροφορίες.
- Πραγματοποιήστε λήψη και εγκατάσταση του Gamma plug-in. Βλ. «Εγκατάσταση του Gamma Plug-in και εισαγωγή του προφίλ προσδιορισμού», σελ. 43 για λεπτομερείς πληροφορίες.
- Συνιστούμε την εξέταση οκτώ δειγμάτων γονιδιωματικού DNA στο ίδιο πείραμα προκειμένου να αξιοποιηθούν καλύτερα οι μάρτυρες, τα πρότυπα και τα μείγματα αντίδρασης. Βλ. «Επεξεργασία δειγμάτων σε όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM με ρότορα 72 σωληναρίων», σελ. 46 για λεπτομερείς πληροφορίες.

## Εγκατάσταση του λογισμικού πυρήνα Rotor-Gene AssayManager v2.1

Το λογισμικό Rotor-Gene AssayManager v2.1 πρέπει να εγκατασταθεί στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM και μπορείτε να το προμηθευτείτε με λήψη από τον ιστότοπο της QIAGEN: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Για αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με την εγκατάσταση του λογισμικού πυρήνα Rotor-Gene AssayManager v2.1, καθώς και για τις απαιτήσεις που αφορούν τον υπολογιστή, ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήση Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

**Σημείωση:** Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit εκτελείται μόνο κατόπιν προγραμματισμού συγκεκριμένων ρυθμίσεων διαμόρφωσης στο λογισμικό Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Για την ασφάλεια των διαδικασιών σε ολόκληρο το σύστημα, πρέπει να καθοριστούν οι ακόλουθες υποχρεωτικές ρυθμίσεις διαμόρφωσης στον κλειστό τρόπο λειτουργίας:

- Material number required (Απαιτείται αριθμός υλικού)
- Valid expiry date required (Απαιτείται έγκυρη ημερομηνία λήξης)
- Lot number required (Απαιτείται αριθμός παρτίδας)

## Εγκατάσταση του Gamma Plug-in και εισαγωγή του προφίλ προσδιορισμού

Αναλυτικές πληροφορίες για την εγκατάσταση και εισαγωγή του Gamma Plug-in και του προφίλ προσδιορισμού παρέχονται στο *Εγχειρίδιο χρήση Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* και το *Εγχειρίδιο χρήση Gamma Plug-in*.

### Για την εγκατάσταση του Gamma Plug-in


1. Πραγματοποιήστε λήψη του Gamma Plug-in και της πιο πρόσφατης έκδοσης του προφίλ προσδιορισμού *ipsogen JAK2 CE IVDR* από τον ιστότοπο της QIAGEN.
2. Κάντε διπλό κλικ στο αρχείο *RGAM\_V2\_1\_Gamma\_Plug-in.Installation.V1\_0\_x .msi* (όπου  $x \geq 0$ ). Ακολουθήστε τις οδηγίες εγκατάστασης.

Για μια αναλυτική περιγραφή αυτής της διαδικασίας ανατρέξτε στην ενότητα «Installing Plug-ins» στο *Εγχειρίδιο χρήση Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

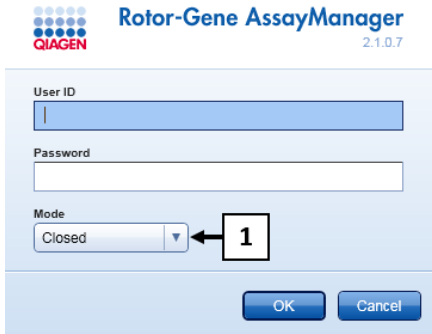
**Σημείωση:** Για την ασφάλεια των διαδικασιών σε ολόκληρο το σύστημα, επιλέξτε την καρτέλα **Settings** (Ρυθμίσεις) και έπειτα επιλέξτε τα πλαίσια **Material number required** (Απαιτείται αριθμός υλικού), **Valid expiry date required** (Απαιτείται έγκυρη ημερομηνία λήξης) και **Lot number required** (Απαιτείται αριθμός παρτίδας) για τον κλειστό τρόπο λειτουργίας (ενότητα Work list (Λίστα εργασιών)). Εάν τα πλαίσια δεν είναι ενεργοποιημένα (επιλεγμένα), κάντε κλικ επάνω τους για να τα ενεργοποιήσετε.

3. Μετά από την επιτυχή εγκατάσταση του πρόσθετου, ένας χρήστης με δικαιώματα διαχειριστή για το λογισμικό Rotor-Gene AssayManager v2.1 θα πρέπει να εισαγάγει το προφίλ προσδιορισμού *ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR*.

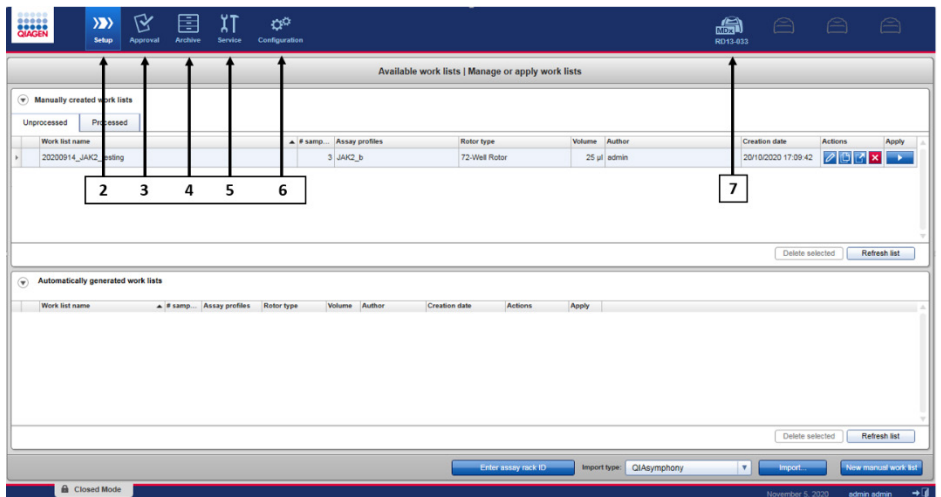
### Για την εισαγωγή του προφίλ προσδιορισμού *ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR*

1. Κάντε κλικ στο εικονίδιο  ώστε το Rotor-Gene AssayManager v2.1 να ανοίξει το λογισμικό.
2. Συνδεθείτε ως χρήστης με δικαιώματα διαχειριστή στον κλειστό τρόπο λειτουργίας (Εικόνα 3).

Ανοίγει το παράθυρο σύνδεσης (Εικόνα 4).

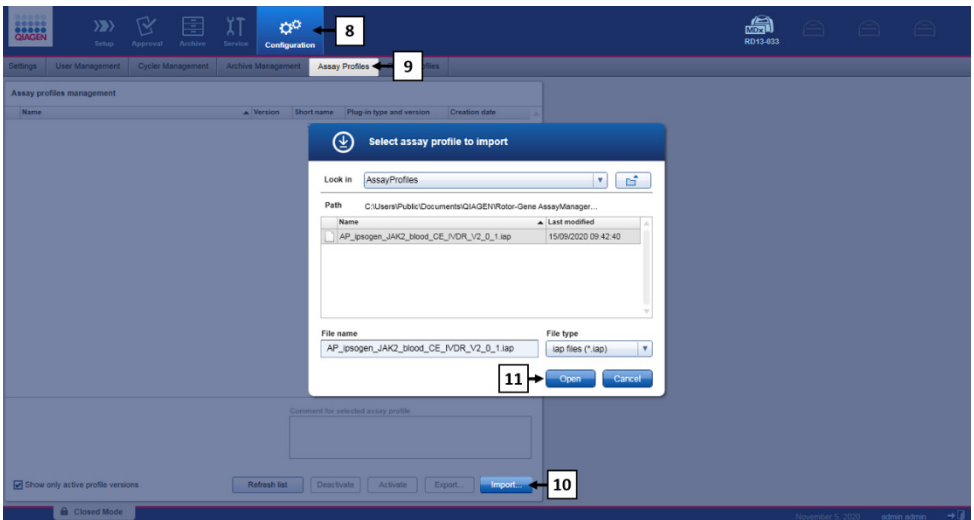


Εικόνα 3. Παράθυρο σύνδεσης του Rotor-Gene AssayManager. 1: Τρόπος λειτουργίας Closed (Κλειστός).



Εικόνα 4. Rotor-Gene AssayManager v.2.1. 2: Περιβάλλον Setup (Ρύθμιση). Χρησιμοποιείται για τη δημιουργία, τη διαχείριση και την εφαρμογή λιστών εργασιών. 3: Περιβάλλον Approval (Έγκριση). Χρησιμοποιείται για την αναζήτηση πειραμάτων που δεν έχουν εκδοθεί ή έχουν εκδοθεί μερικώς και για την έγκριση ειδικών δειγμάτων. Οι αναφορές των πειραμάτων δημιουργούνται με την έκδοση ενός δείγματος. 4: Περιβάλλον Archive (Αρχειο). Χρησιμοποιείται για την αναζήτηση πειραμάτων που έχουν εκδοθεί πλήρως και μερικώς, καθώς και για τη δημιουργία αναφορών πειραμάτων με χρήση προκαθορισμένων προφίλ αναφοράς. 5: Περιβάλλον Service (Τεχνική υποστήριξη). Περιλαμβάνει τις καρτέλες Audit Trail (Ιχνη ελέγχου) και Re-usable Data (Επαναχρησιμοποιούμενα δεδομένα). 6: Configuration (Διαμόρφωση). Χρησιμοποιείται για την προσαρμογή των ρυθμίσεων του Rotor-Gene AssayManager. 7: Εικονίδιο του Rotor-Gene Q. Χρησιμοποιείται για τη διακοπή ή την ολοκλήρωση μιας εκτέλεσης και για την αποδέσμευση ενός κυκλοποιητή μετά την ολοκλήρωση μιας εκτέλεσης (και τον έλεγχο σύνδεσης του οργάνου).

3. Κάντε κλικ στο περιβάλλον Configuration (Διαμόρφωση) (Εικόνα 4, πλαίσιο 6) (Εικόνα 5, πλαίσιο 8).
4. Κάντε κλικ στην καρτέλα Assay Profiles (Προφίλ προσδιορισμού) (Εικόνα 5, πλαίσιο 9).
5. Κάντε κλικ στο **Import** (Εισαγωγή) (Εικόνα 5, πλαίσιο 10).
6. Στο πλαίσιο διαλόγου Select assay profile to import (Επιλέξτε προφίλ προσδιορισμού προς εισαγωγή), επιλέξτε το προφίλ προσδιορισμού *ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR*. Κάντε κλικ στο **Open** (Άνοιγμα) (Εικόνα 5, πλαίσιο 11).



**Εικόνα 5. Εισαγωγή του προφίλ προσδιορισμού.** 8: Περιβάλλον Configuration (Διαμόρφωση), 9: Καρτέλα Assay profile (Προφίλ προσδιορισμού), 10: Κομπότι Import (Εισαγωγή), 11: Κομπότι Open (Άνοιγμα).

7. Μόλις ολοκληρωθεί επιτυχώς η εισαγωγή του προφίλ προσδιορισμού, μπορείτε να το χρησιμοποιήσετε στο περιβάλλον Setup (Ρύθμιση) (Εικόνα 4, πλαίσιο 2).

**Σημείωση:** Δεν μπορεί να εισαχθεί δύο φορές η ίδια έκδοση προφίλ προσδιορισμού.

## Επεξεργασία δειγμάτων σε όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM με ρότορα 72 σωληναρίων

Συνιστούμε την εξέταση οκτώ δειγμάτων γονιδιωματικού DNA στο ίδιο πείραμα προκειμένου να αξιοποιηθούν καλύτερα οι μάρτυρες, τα πρότυπα και τα μείγματα αντίδρασης.

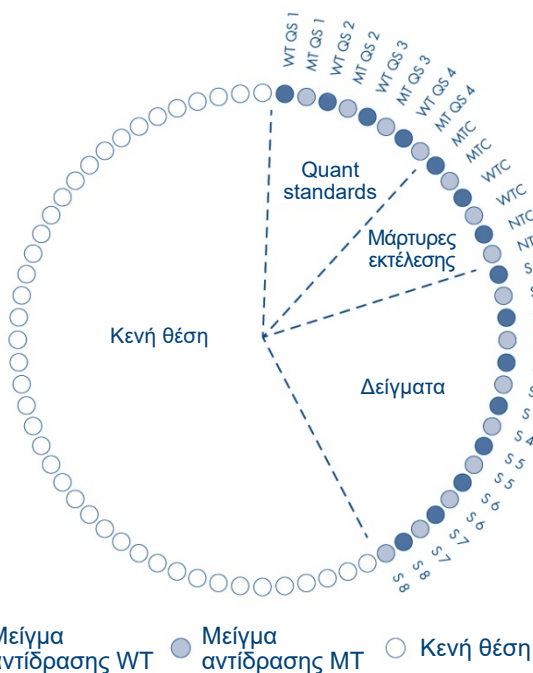
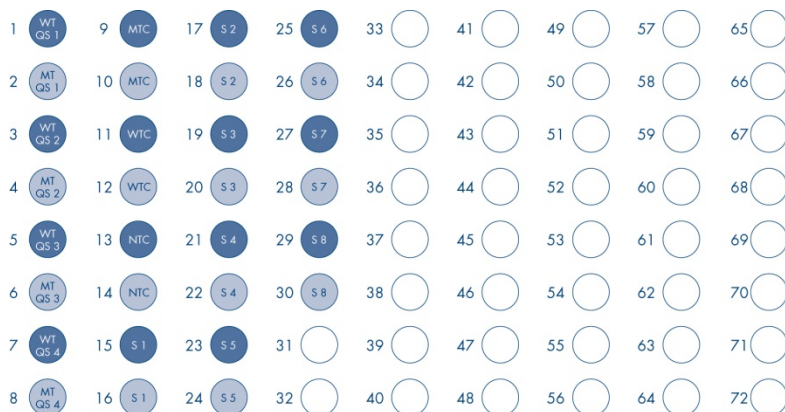
Ο Πίνακας 3 περιλαμβάνει τον αριθμό των αντιδράσεων που μπορούν να διενεργηθούν με χρήση του ρότορα 72 σωληναρίων.

Το σχηματικό διάγραμμα στην Εικόνα 6 αποτελεί παράδειγμα της διάταξης του μπλοκ φόρτωσης και του ρότορα για ένα πείραμα με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις θέσεις στο μπλοκ φόρτωσης και υποδεικνύουν την τελική θέση του ρότορα.

**Πίνακας 3. Αριθμός αντιδράσεων για το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM με ρότορα 72 σωληναρίων**

Δείγματα	Αριθμός αντιδράσεων
<b>Με το JAK2 MT Reaction Mix</b>	
8 δείγματα γονιδιωματικού DNA	8
Πρότυπα ποσοτικοποίησης JAK2 MT (μεταλλαγμένο)	4
Μάρτυρας JAK2 MT (μεταλλαγμένο)	1
Μάρτυρας JAK2 WT (άγριου τύπου)	1
Νερό για μάρτυρα χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC)	1
<b>Με το JAK2 WT Reaction Mix</b>	
8 δείγματα γονιδιωματικού DNA	8
Πρότυπα ποσοτικοποίησης JAK2 WT (άγριου τύπου)	4
Μάρτυρας JAK2 MT (μεταλλαγμένο)	1
Μάρτυρας JAK2 WT (άγριου τύπου)	1
Νερό για NTC	1



**Εικόνα 6. Συνιστώμενη διάταξη πλάκας και ρότορα για πείραμα με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.**  
 WTC: Μάρτυρας JAK2 WT, MTC: Μάρτυρας JAK2 MT (μεταλλαγμένο), WT-QS: Πρότυπα ποσοτικοποίησης JAK2 WT, MT-QS: Πρότυπα ποσοτικοποίησης JAK2 MT, S: δείγμα γονιδιωματικού DNA, NTC: μάρτυρας χωρίς μήτρα (νερό).



Τα σωληνάρια πρέπει να εισάγονται στον ρότορα, όπως υποδεικνύεται στην Εικόνα 6, καθώς η αυτοματοποιημένη ανάλυση που έχει οριστεί στο προφίλ προσδιορισμού βασίζεται σε αυτήν την οργάνωση. Αν χρησιμοποιηθεί άλλη διάταξη, θα προκύψουν μη φυσιολογικά αποτελέσματα.

**Σημείωση:** Όλες οι θέσεις που δεν χρησιμοποιούνται πρέπει να καλύπτονται από κενά πωματισμένα σωληνάρια.



## qPCR στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM με ρότορα 72 σωληναρίων

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη:

- Δημιουργήστε μια λίστα εργασιών για τα δείγματα προς επεξεργασία.

### Για τη δημιουργία μιας λίστας εργασιών

1. Ενεργοποιήστε το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
2. Ανοίξτε το λογισμικό Rotor-Gene AssayManager v2.1 και συνδεθείτε ως χρήστης με ρόλο χειριστή στον κλειστό τρόπο λειτουργίας (Εικόνα 3, πλαίσιο 1).
3. Βεβαιωθείτε ότι το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ανιχνεύεται κανονικά από το λογισμικό πριν να ξεκινήσετε την εκτέλεση (Εικόνα 7).



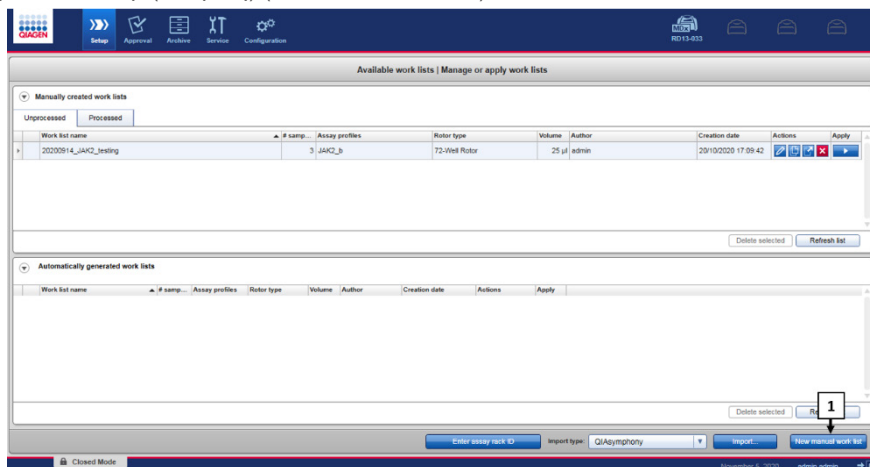
Μη συνδεδεμένο



Συνδεδεμένο

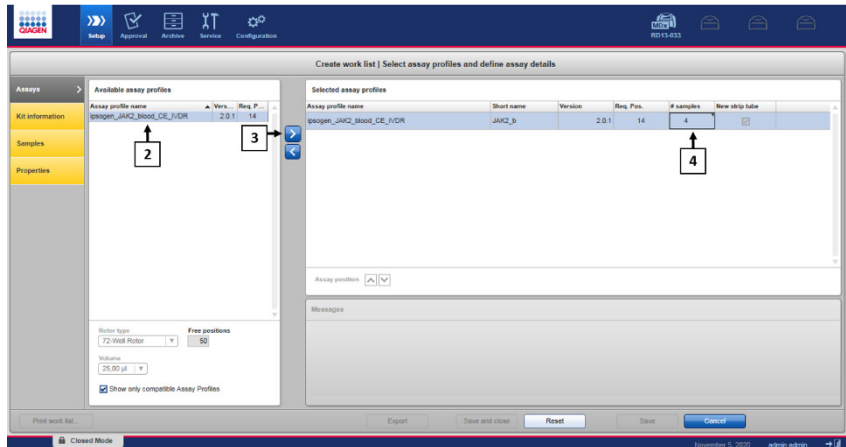
Εικόνα 7. Κατάσταση σύνδεσης του Rotor-Gene Q.

4. Κάντε κλικ στο «New manual work list» (Νέα χειροκίνητη λίστα εργασιών) στο περιβάλλον Setup (Ρύθμιση) (Εικόνα 8, πλαίσιο 1).



Εικόνα 8. Δημιουργία λίστας εργασιών. 1: Κομπτί δημιουργίας νέας λίστας εργασιών.

5. Επιλέξτε το προφίλ προσδιορισμού «**ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR**» από τη λίστα με τα διαθέσιμα προφίλ προσδιορισμού στο βήμα «Assay» (Προσδιορισμός) (Εικόνα 9, πλαίσιο 2).



**Εικόνα 9. Δημιουργία λίστας εργασιών – Επιλογή προφίλ προσδιορισμού.** 2: Διαθέσιμα προφίλ προσδιορισμού. 3: Μεταφορά προφίλ προσδιορισμού στη λίστα εργασιών. 4: Εισαγωγή αριθμού δειγμάτων.

6. Κάντε κλικ στο «>» για να μετακινήσετε το επιλεγμένο προφίλ προσδιορισμού στη λίστα «**Selected assay profiles**» (Επιλεγμένα προφίλ προσδιορισμού) (Εικόνα 9, πλαίσιο 3). Το προφίλ προσδιορισμού θα πρέπει πλέον να εμφανίζεται στη λίστα «**Selected assay profiles**» (Επιλεγμένα προφίλ προσδιορισμού).
7. Εισαγάγετε τον αριθμό των δειγμάτων στο αντίστοιχο πεδίο (Εικόνα 9, πλαίσιο 4).
8. Κάντε κλικ στο βήμα «Kit Information» (Πληροφορίες κιτ) και εισαγάγετε χειροκίνητα τις παρακάτω πληροφορίες που αφορούν το κιτ JAK2 και που αναγράφονται στο καπάκι του κουτιού:
- Material number (Αριθμός υλικού) 1120216 (Εικόνα 10, πλαίσιο 6)
  - Valid expiry date (Εγκυρη ημερομηνία λήξης) (Εικόνα 10, πλαίσιο 7)
  - Lot number (Αριθμός παρτίδας) (Εικόνα 10, πλαίσιο 8)
- Σημείωση:** Εναλλακτικά, μπορεί να εισαχθεί ή να σαρωθεί ο γραμμωτός κώδικας του κιτ (Εικόνα 10, πλαίσιο 5).

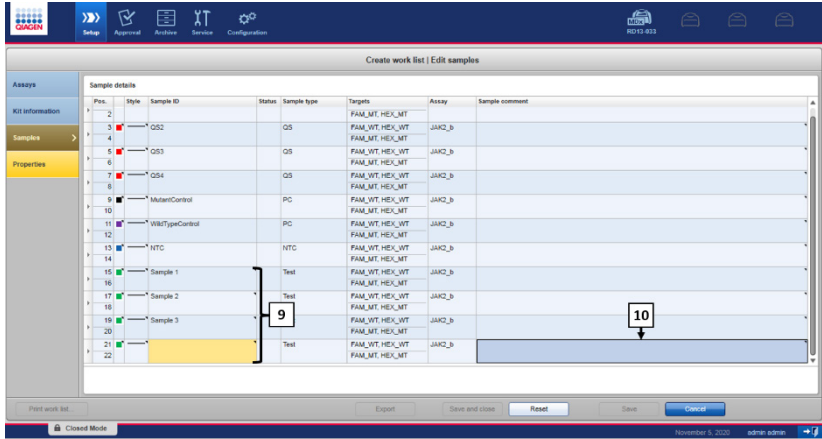
**Σημείωση:** Πρέπει να συμπληρωθούν όλα τα πεδία. Τα πεδία επισημαίνονται με γαλάζιο χρώμα μετά την εισαγωγή των στοιχείων (π.χ., έχουν εισαχθεί στοιχεία ότι το kit δεν έχει λήξει και έγκυροι αριθμοί υλικού και παρτίδας).

**Εικόνα 10. Δημιουργία λίστας εργασιών - Εισαγωγή πληροφοριών kit.** 5: Kit bar code (Γραμμωτός κώδικας kit) (μπορεί να σαρωθεί ή να εισαχθεί χειροκίνητα, αν εισαχθεί, τα υπόλοιπα πεδία συμπληρώνονται αυτόματα). 6: Material number (Αριθμός υλικού). 7: Kit Expiry date (Ημερομηνίας λήξης kit). 8: Lot number (Αριθμός παρτίδας). Οι πληροφορίες αυτές αναγράφονται στο κουτί του kit.

#### 9. Επιλέξτε το βήμα «Samples» (Δείγματα).

Εμφανίζεται μια λίστα με λεπτομερή στοιχεία για το δείγμα. Η λίστα αναπαριστά την αναμενόμενη διάταξη του ρότορα.

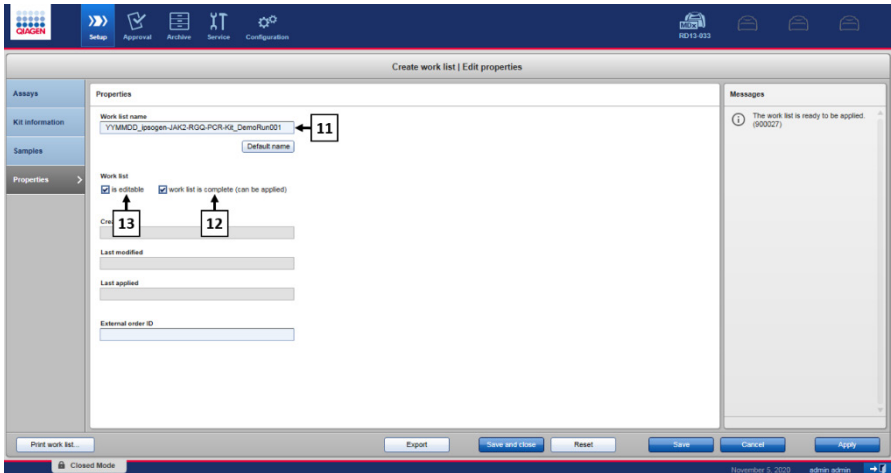
10. Εισαγάγετε τα αναγνωριστικά (ID) των δειγμάτων (Εικόνα 11, πλαίσιο 9) στη λίστα, καθώς και τυχόν προαιρετικές πληροφορίες δείγματος (Εικόνα 11, πλαίσιο 10) ως σχόλιο για κάθε δείγμα.



**Εικόνα 11. Δημιουργία λίστας εργασιών, εισαγωγή πληροφοριών δείγματος.** 9: Sample ID (Αναγνωριστικό δείγματος). 10: Sample comments (Σχόλια δείγματος) (προαιρετικά)

11. Επιλέξτε το βήμα «Properties» (Ιδιότητες). Εισαγάγετε όνομα λίστας εργασιών (Εικόνα 12, πλαίσιο 11).

12. Επιλέξτε το πλαίσιο «work list is complete (can be applied)» (η λίστα εργασιών έχει ολοκληρωθεί (μπορεί να εφαρμοστεί)) (Εικόνα 12, πλαίσιο 12).



**Εικόνα 12. Δημιουργία λίστας εργασιών – Ιδιότητες.** 11: Work list name (Όνομα λίστας εργασιών).

12: Επιλέξτε το πεδίο «work list is complete» (η λίστα εργασιών έχει ολοκληρωθεί). 13: Αποεπιλέξτε το πεδίο «is editable» (με δυνατότητα επεξεργασίας) μόνο αν η λίστα εργασιών δεν πρόκειται να αλλάξει.

**Σημείωση:** Το πλαίσιο επιλογής «is editable» (με δυνατότητα επεξεργασίας) (Εικόνα 12, πλαίσιο 13) ορίζει αν εξακολουθεί να υπάρχει δυνατότητα επεξεργασίας στη λίστα εργασιών. Αν η λίστα εργασιών μπορεί να εφαρμοστεί και δεν πρόκειται να αλλάξει, αποεπιλέξτε το πλαίσιο «is editable» (με δυνατότητα επεξεργασίας).

13. Αποθηκεύστε τη λίστα εργασιών.
14. Μπορείτε να εκτυπώσετε τη λίστα εργασιών, μια ενέργεια που μπορεί να βοηθήσει στην προετοιμασία και ρύθμιση της qPCR. Για να εκτυπώσετε τη λίστα εργασιών, κάντε κλικ στο «**Print work list**» (Εκτύπωση λίστας εργασιών). Οι πληροφορίες δείγματος περιλαμβάνονται στη λίστα εργασιών.

**Σημείωση:** Η λίστα εργασιών μπορεί να αποθηκευτεί και να εκτελεστεί αργότερα ή μπορεί να δημιουργηθεί με τη φόρτωση του πειράματος στο όργανο και να τεθεί απευθείας σε εφαρμογή.

## Διαδικασία

### Προετοιμασία του πειράματος qPCR

1. Αποψύξτε όλα τα απαιτούμενα συστατικά εκτός από την *Taq* DNA πολυμεράση, η οποία πρέπει να φυλάσσεται στον καταψύκτη όταν δεν χρησιμοποιείται. Τοποθετήστε σε πάγο τα σωληνάρια που περιέχουν τα συστατικά που θα αποψυχθούν για χρήση.  
**Σημαντικό:** Η διάρκεια του σταδίου απόψυξης δεν θα πρέπει να υπερβεί τα 30 λεπτά, ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος υποβάθμισης του υλικού.
2. Καθαρίστε την επιφάνεια του πάγκου που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την παρασκευή των μειγμάτων PCR ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση από μήτρα ή από νουκλεάσες.
3. Αναμείξτε προσεκτικά τα σωληνάρια με τα πρότυπα, τους μάρτυρες και τα μείγματα αντίδρασης αναστρέφοντας 10 φορές και φυγοκεντρίστε στιγμιαία πριν από τη χρήση.
4. Παρασκευάστε τα παρακάτω κύρια μείγματα qPCR ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

**Σημείωση:** Όλες οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 4 και ο Πίνακας 5 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων MT και ενός WT που έχουν υπολογιστεί για την επίτευξη τελικών όγκων αντίδρασης 25 μl. Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για την αντιστάθμιση τυχόν σφάλματος στη διανομή με πιπέτα, για 8 δείγματα και μάρτυρες.

**Πίνακας 4. Παρασκευή κύριων μειγμάτων qPCR για ανίχνευση αλληλουχίας JAK2 MT**

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	15 + 1* αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
JAK2 MT Reaction Mix	19,8	316,8	1x
<i>Taq</i> DNA πολυμεράση	0,2	3,2	1x
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 6)	5	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	–

\* Συμπεριλαμβάνεται επιπλέον νεκρός όγκος αντίδρασης.

**Πίνακας 5. Παρασκευή κύριων μειγμάτων qPCR για ανίχνευση αλληλουχίας JAK2 WT**

<b>Συστατικό</b>	<b>1 αντίδραση (μl)</b>	<b>15 + 1* αντιδράσεις (μl)</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
JAK2 WT Reaction Mix	19,8	316,8	1x
Taq DNA πολυμεράση	0,2	3,2	1x
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 6)	5	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	–

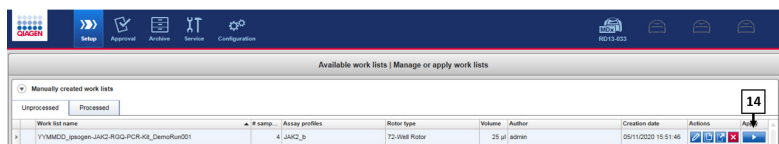
\* Συμπεριλαμβάνεται επιπλέον νεκρός όγκος αντίδρασης.

**Σημαντικό:** Αναδεύστε σε vortex και φυγοκεντρίστε στιγμιαία το κύριο μείγμα qPCR πριν από τη διανομή 20 μl σε κάθε σωληνάριο της σειράς.

5. Προσθέστε το νερό του μάρτυρα χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC) στα αντίστοιχα σωληνάρια και κλείστε τα.
6. **Σημαντικό:** Αναδεύστε σε vortex και φυγοκεντρίστε στιγμιαία το DNA (δείγματα γονιδιωματικού DNA συν QS και μάρτυρες). Στη συνέχεια, προσθέστε 5 μl υλικού που θα ποσοτικοποιηθεί στο αντίστοιχο σωληνάριο, με στόχο έναν τελικό όγκο 25 μl. Αναμείξτε ήπια με επανειλημμένη αναρρόφηση και διανομή με πιπέτα.  
**Σημείωση:** Αλλάζετε ρύγχη μεταξύ των σωληναρίων για την αποφυγή μη ειδικής επιμόλυνσης μήτρας ή μείγματος αντίδρασης και, κατά συνέπεια, τυχόν ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Ξεκινήστε προσθέτοντας τα δείγματα εξέτασης και στη συνέχεια τα πρότυπα και τους μάρτυρες.
7. Επανατοποθετήστε όλα τα συστατικά του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit στον καταψύκτη για να αποφύγετε τυχόν υποβάθμιση των υλικών.

## Έναρξη της εκτέλεσης

1. Προετοιμάστε το Rotor-Gene Q MDx και ξεκινήστε την εκτέλεση ως εξής.
  - 1a. Τοποθετήστε έναν ρότορα 72 βυθισμάτων στη βάση στήριξης ρότορα του Rotor-Gene Q MDx.
  - 1b. Γεμίστε τον ρότορα με σωληνάρια ανάλογα με τις αντιστοιχισμένες θέσεις, ξεκινώντας από τη θέση 1, Εικόνα 6 (σελίδα 47), τοποθετώντας κενά πωματισμένα σωληνάρια σε όλες τις θέσεις που δεν χρησιμοποιούνται.  
**Σημείωση:** Βεβαιωθείτε ότι το πρώτο σωληνάριο είναι τοποθετημένο στη θέση 1 και ότι τα σωληνάρια είναι τοποθετημένα με τον σωστό προσανατολισμό και στις σωστές θέσεις, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.
  - 1c. Προσαρτήστε τον δακτύλιο ασφάλισης.
  - 1d. Φορτώστε τον στροφέα και τον δακτύλιο ασφάλισης στο όργανο Rotor-Gene Q MDx και κλείστε το καπάκι του οργάνου.
  - 1e. Στο περιβάλλον του λογισμικού Rotor-Gene AssayManager v2.1, επιλέξτε την αντίστοιχη λίστα εργασιών από το πρόγραμμα διαχείρισης λιστών εργασιών και κάντε κλικ στην επιλογή «Apply» (Εφαρμογή) (Εικόνα 13, πλαίσιο 14). Αν η λίστα εργασιών είναι ακόμη ανοιχτή, κάντε κλικ στην επιλογή «Apply» (Εφαρμογή).



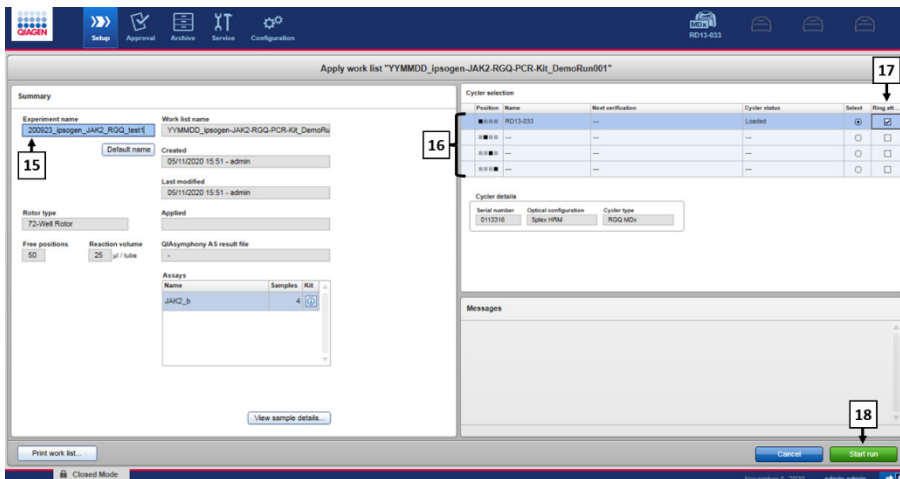
Εικόνα 13. Προετοιμασία εκτέλεσης - Επιλογή λίστας εργασιών. 14: Κουμπιά Apply (Εφαρμογή).

**Σημείωση:** Εάν δεν έχει δημιουργηθεί η συγκεκριμένη για το πείραμα λίστα εργασιών, συνδεθείτε στο Rotor-Gene AssayManager v2.1 και ακολουθήστε τη διαδικασία στην ενότητα «Για τη δημιουργία μιας λίστας εργασιών», σελίδα 49, πριν προχωρήσετε ως εξής.

- Εισαγάγετε το όνομα του πειράματος (Εικόνα 14, πλαίσιο 15).
- Επιλέξτε τον κυκλοποιητή που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί από τη λίστα «Cycler selection» (Επιλογή κυκλοποιητή) (Εικόνα 14, πλαίσιο 16).



- Ελέγξτε ότι έχει προσαρτηθεί σωστά ο δακτύλιος ασφάλισης και επιβεβαιώστε στην οθόνη ότι ο δακτύλιος ασφάλισης είναι όντως προσαρτημένος (Εικόνα 14, πλαίσιο 17).
- Κάντε κλικ στο «**Start run**» (Έναρξη εκτέλεσης) (Εικόνα 14, πλαίσιο 18).



**Εικόνα 14. Προετοιμασία εκτέλεσης – Ρυθμίσεις εκτέλεσης.** 15: Experiment name (Όνομα πειράματος). 16: Cycler selection (Επιλογή κυκλοποιητή). 17: Ελέγξτε και επιβεβαιώστε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης είναι τοποθετημένος. 18: Κουμπί Start run (Έναρξη εκτέλεσης).

1f. Θα πρέπει να ξεκινήσει η εκτέλεση JAK2 RGQ PCR.

## Τερματισμός, έκδοση και έγκριση της εκτέλεσης

1. Μόλις ολοκληρωθεί ή εκτέλεση, κάντε κλικ στην επιλογή «**Finish run**» (Ολοκλήρωση ανάλυσης).

**Σημείωση:** Μέχρι να ολοκληρωθεί αυτό το βήμα, το πείραμα δεν αποθηκεύεται στην εσωτερική βάση δεδομένων.

**Σημείωση:** Η ανάλυση των δεδομένων που έχουν ληφθεί εκτελείται αυτόματα ανάλογα με το πρόσθετο που αντιστοιχεί στο προφίλ προσδιορισμού και με τους κανόνες και τις τιμές παραμέτρων που ορίζονται από το προφίλ προσδιορισμού.

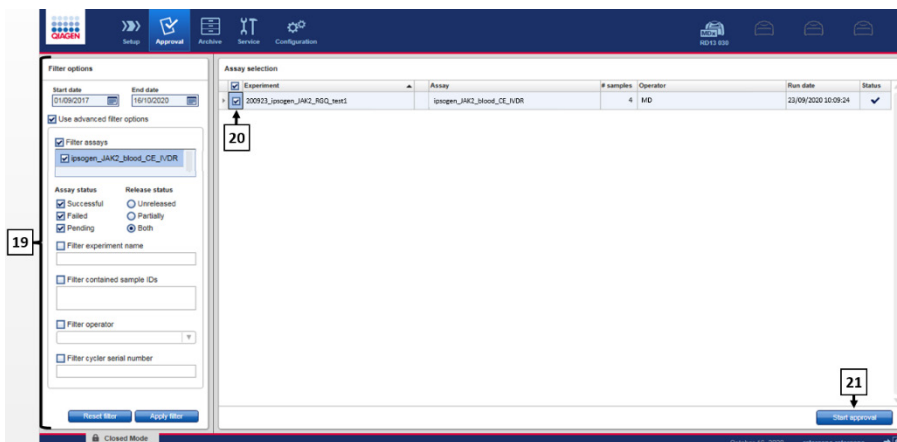
2. Εκτελέστε έκδοση και έγκριση της ανάλυσης.

- Οι χρήστες που έχουν συνδεθεί με τον ρόλο Approver (Υπεύθυνος έγκρισης) πρέπει να κάνουν κλικ στην επιλογή **«Release and go to approval»** (Έκδοση και μετάβαση στην έγκριση).
- Οι χρήστες που έχουν συνδεθεί με τον ρόλο Operator (Χειριστής) πρέπει να κάνουν κλικ στην επιλογή **«Release»** (Έκδοση).

**Σημείωση:** Οι γενικές λειτουργίες του περιβάλλοντος Approval (Έγκριση) περιγράφονται στο Εγχειρίδιο χρήστη «Gamma Plug-in» του Rotor-Gene AssayManager v2.1.

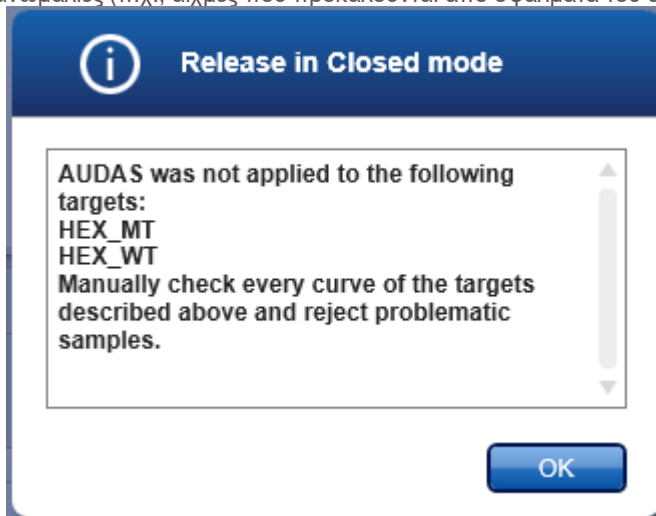
3. Εκτελέστε έκδοση των αποτελεσμάτων.

- Εάν κάνετε κλικ στην επιλογή **«Release and go to approval»** (Έκδοση και μετάβαση στην έγκριση), τα αποτελέσματα του πειράματος εμφανίζονται στο περιβάλλον «Approval» (Έγκριση).
- Εάν κάνετε κλικ στην επιλογή **«Release»** (Έκδοση), απαιτείται σύνδεση χρήστη με ρόλο «Approver» (Υπεύθυνος έγκρισης) για να επιλέξει το περιβάλλον «Approval» (Έγκριση).
- Ρυθμίστε τις επιλογές φίλτρου (Εικόνα 15, πλαίσιο 19) για να επιλέξετε το πείραμα προς έγκριση (Εικόνα 15, πλαίσιο 20). Στη συνέχεια, κάντε κλικ στο **«Apply»** (Εφαρμογή) (Εικόνα 15, πλαίσιο 21).



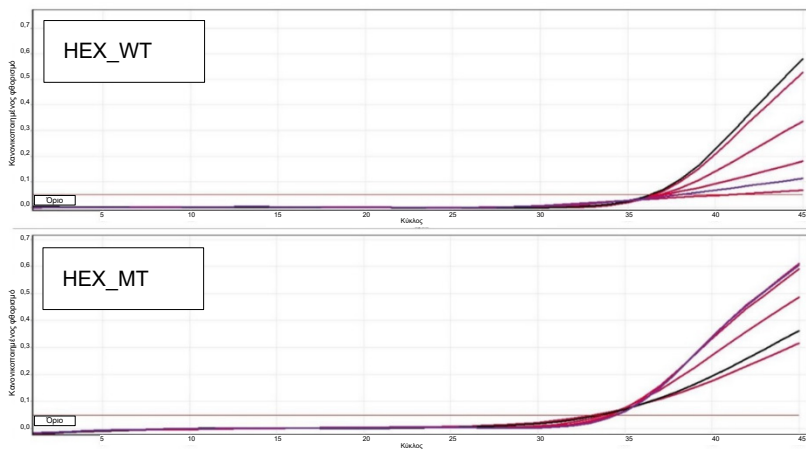
Εικόνα 15. Έγκριση εκτέλεσης - Επιλογή πειράματος. 19: Filter options (Επιλογές φίλτρου). 20: Assay Selection (Επιλογή προσδιορισμού). 21: Κουμπί Start approval (Έναρξη έγκρισης).

- Εμφανίζεται η παρακάτω προειδοποίηση AUDAS (Αυτόματη σάρωση δεδομένων) (Εικόνα 16). Στην ενότητα «Plots and Information» (Διαγράμματα και πληροφορίες) ελέγξτε χειροκίνητα τις καμπύλες φθορισμού των στόχων HEX για τυχόν ανωμαλίες (π.χ., αιχμές που προκαλούνται από σφάλματα του υλικού).



Εικόνα 16. Προειδοποίηση AUDAS.

**Σημείωση:** Οι καμπύλες των στόχων HEX εσωτερικού μάρτυρα δεν παρουσιάζουν τα τυπικά σιγμοειδή σχήματα (όπως οι καμπύλες στο παράδειγμα στην Εικόνα 17) και πρέπει να θεωρούνται έγκυρες καμπύλες. Λάβετε υπόψη ότι όλα τα υπόλοιπα κριτήρια εγκυρότητας εσωτερικού μάρτυρα (π.χ. οι οριακές τιμές αποκοπής C<sub>T</sub>) ελέγχονται αυτόματα από το λογισμικό.





**Εικόνα 17. Καμπύλες HEX εσωτερικού μάρτυρα.**

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων εξέτασης αναλύονται αυτόματα από το Rotor-Gene AssayManager v2.1 αλλά πρέπει να εγκριθούν και να εκδοθούν από τον χρήστη που συνδέεται με ρόλο υπεύθυνου έγκρισης. Αρχικά, όλα τα δείγματα εξέτασης ενός ολοκληρωμένου πειράματος έχουν κατάσταση «Undefined» (Μη προσδιορισμένο). Κάποια αποτελέσματα προς έγκριση έχουν τρία κουμπιά έγκρισης στο τέλος της αντίστοιχης σειράς. Τα κουμπιά εξυπηρετούν την αλληλεπίδραση με τον χρήστη για την αποδοχή ή την απόρριψη των αποτελεσμάτων του δείγματος (Εικόνα 18 και Εικόνα 19).

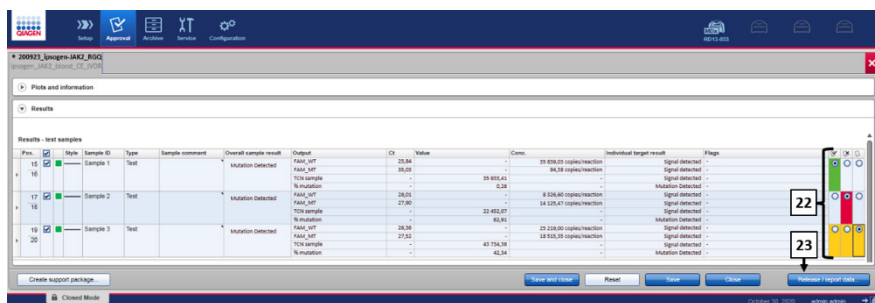
**Σημείωση:** Ένα δείγμα που αναφέρεται ως «INVALID» (Μη έγκυρο) από το Rotor-Gene AssayManager v2.1 δεν μπορεί να χαρακτηριστεί εκ νέου ως «VALID» (Έγκυρο) ακόμα και αν απορριφθεί το αποτέλεσμα του δείγματος.

**Σημείωση:** Το δείγμα πρέπει να απορρίπτεται αν ο χρήστης δεν συμφωνεί με το αποτέλεσμα και επιθυμεί επανεξέταση (π.χ. σε περίπτωση που παρατηρηθεί ανωμαλία στις καμπύλες των στόχων HEX εσωτερικού μάρτυρα).

- Αξιολογήστε το αποτέλεσμα (Εικόνα 19, πλαίσιο 22) και κάντε κλικ στο «Release/Report data» (Έκδοση/Αναφορά δεδομένων) (Εικόνα 19, πλαίσιο 23).

Χρώμα φόντου	Κατάσταση του δείγματος εξέτασης
	Μη προσδιορισμένο
	Αποδεκτό
	Απορριπτό

Εικόνα 18. Ορισμός της κατάστασης έγκρισης του δείγματος.



Εικόνα 19. Έκδοση και αναφορά των δεδομένων. 22: Κουμπιά έγκρισης δειγμάτων (για την έγκριση (✓) ή την απόρριψη (✗) των αποτελεσμάτων κάθε δείγματος). 23: Κουμπιά έκδοσης και αναφοράς δεδομένων.

- Εισαγάγετε κωδικό πρόσβασης αν χρειάζεται, επιλέξτε το πλαίσιο «Create report» (Δημιουργία αναφοράς) και κάντε κλικ στο «OK» (Εικόνα 20, πλαίσια 24 και 25). Η αναφορά θα δημιουργηθεί σε μορφή .pdf και θα αποθηκευτεί αυτόματα στον προκαθορισμένο φάκελο.

Η προεπιλεγμένη διαδρομή φακέλου είναι:

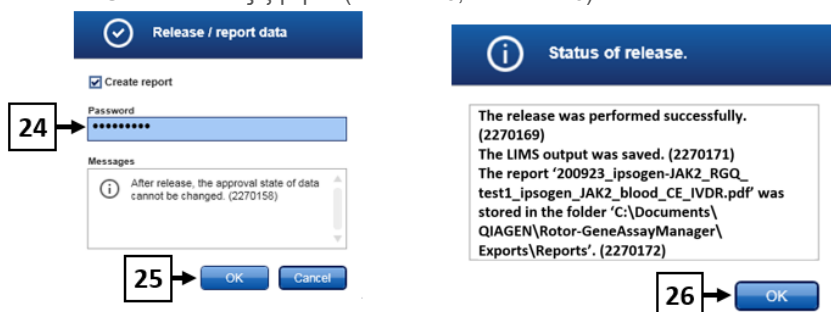
**C:** > Users (Χρήστες) > Public (Δημόσιο) > Documents (Έγγραφα) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Εξαγωγή) > Reports (Αναφορές).

**Σημείωση:** Μπορείτε να αλλάξετε τη διαδρομή και τον φάκελο από το περιβάλλον Configuration (Διαμόρφωση).

- Ταυτόχρονα, δημιουργείται αυτόματα ένα αρχείο LIMS και αποθηκεύεται στον προκαθορισμένο φάκελο. Η προεπιλεγμένη διαδρομή φακέλου είναι: **C: > Users (Χρήστες) > Public (Δημόσιο) > Documents (Έγγραφα) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Εξαγωγή) > LIMS.**

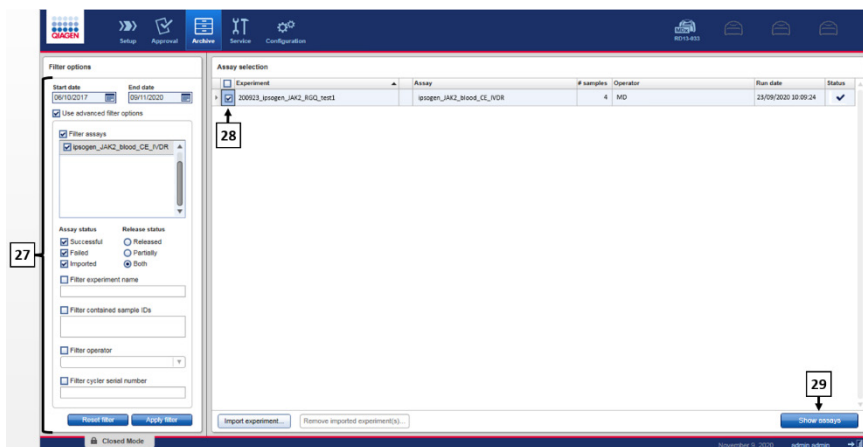
**Σημείωση:** Μπορείτε να αλλάξετε τη διαδρομή και τον φάκελο από το περιβάλλον «Configuration» (Διαμόρφωση).

- Κλείστε το αρχείο pdf και επιστρέψτε στο Rotor-Gene AssayManager. Κάντε κλικ στο «**OK**» όταν σας ζητηθεί (Εικόνα 20, πλαίσιο 26).



**Εικόνα 20. Έκδοση και αναφορά των δεδομένων.** 24: Κωδικός πρόσβασης χρήστη. 25-26: Κουμπιά OK για την ολοκλήρωση της επιλογής.

- Μετά την εισαγωγή κωδικού πρόσβασης χρήστη, δημιουργείται και ανοίγει μια αναφορά σε μορφή PDF. Κλείστε την αναφορά σε μορφή PDF. Στη συνέχεια δημιουργείται αυτόματα ένα αρχείο LIMS και εμφανίζεται μια δήλωση έκδοσης. Κάντε κλικ στο «**OK**». Έχει πραγματοποιηθεί πλήρης έκδοση του προσδιορισμού. Κάντε κλικ στο «**OK**» για να μεταβείτε στο περιβάλλον «Archive» (Αρχείο).
- Κάντε κλικ στην καρτέλα «Archive» (Αρχείο) για να εξαγάγετε το αρχείο .rex το οποίο αντιστοιχεί στα πρωτογενή δεδομένα. Εντοπίστε το επιθυμητό πείραμα χρησιμοποιώντας τις επιλογές φίλτρου (Εικόνα 21, πλαίσια 27 και 28) και κάντε κλικ στην επιλογή «Show assays» (Προβολή προσδιορισμών) (Εικόνα 21, πλαίσιο 29).



**Εικόνα 21. Περιβάλλον Archive (Αρχείο).** 27: Filter options (Επιλογές φίλτρου). 28: Assay Selection (Επιλογή προσδιορισμού). 29: Κουμπί Show assays (Προβολή προσδιορισμών).

- Εμφανίζονται τα αποτελέσματα του πειράματος. Στην κάτω δεξιά γωνία της οθόνης, επιλέξτε «**rex-file**» ως τύπο αρχείου προς εξαγωγή. Κάντε κλικ στο «**Export**» (Εξαγωγή). Κάντε κλικ στο «**OK**» για να αποθηκεύσετε. Το λογισμικό θα αποθηκεύσει αυτόματα το αρχείο .rex στον εξής προκαθορισμένο φάκελο: **C: > Users (Χρήστες) > Public (Δημόσιο) > Documents (Εγγραφα) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Εξαγωγή) > Experiments (Πειράματα)**. **Σημείωση:** Μπορείτε να αλλάξετε τη διαδρομή και τον φάκελο από την καρτέλα «Specify the .rex file export destination» (Καθορισμός του προορισμού εξαγωγής του αρχείου .rex). **Σημείωση:** Για την αντιμετώπιση προβλημάτων, απαιτείται πακέτο υποστήριξης από την ανάλυση. Πακέτα υποστήριξης μπορούν να δημιουργηθούν από το περιβάλλον έγκρισης ή αρχείου (*Εγχειρίδιο χρήση Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*, ενότητα «Troubleshooting» (Αντιμετώπιση προβλημάτων), «Creating a support package» (Δημιουργία πακέτου υποστήριξης)). Επιπλέον, τα ίχνη ελέγχου από την ώρα του συμβάντος  $\pm 1$  ημέρα ενδέχεται να είναι βοηθητικά. Μπορείτε να ανακτήσετε ίχνη ελέγχου από το περιβάλλον «Service» (Τεχνική υποστήριξη) (*Εγχειρίδιο χρήση Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*, Ενότητα 1.5.5.5).

4. Εκφορτώστε το όργανο Rotor-Gene Q MDx και απορρίψτε τα σωληνάρια σύμφωνα με τις τοπικές διατάξεις για την ασφάλεια.



## Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Η ανάλυση είναι πλήρως αυτοματοποιημένη.

Το Rotor-Gene AssayManager v2.1 αναλύει πρώτα\* τις καμπύλες ενίσχυσης και ενδέχεται να χαρακτηρίσει μη έγκυρες τις αποκλίνουσες καμπύλες ανάλογα με το σχήμα και το πλάτος του θορύβου. Σε αυτήν την περίπτωση, στις καμπύλες που έχουν χαρακτηριστεί μη έγκυρες αντιστοιχίζεται μια ένδειξη.

Στη συνέχεια, το Rotor-Gene AssayManager v2.1 αναλύει τους μάρτυρες της εκτέλεσης:

- NTC: Ο NTC ελέγχεται για τυχόν απουσία ειδικής ενίσχυσης (JAK2 WT και JAK2 MT).
- WT και MT QS: Η επικύρωση των προτύπων ποσοτικοποίησης βασίζεται στις τιμές  $R^2$  και κλίσης κάθε πρότυπης καμπύλης.
- WTC: Ο συνολικός αριθμός αντιγράφων (Total Copy Number, TCN) του JAK2 πρέπει να είναι αρκετά υψηλός για να είναι δυνατή η ερμηνεία του συγκεκριμένου μάρτυρα. Σε αυτήν την περίπτωση, θα υπολογιστεί το ποσοστό μετάλλαξης του JAK2. Ο μάρτυρας εκτέλεσης επικυρώνεται εφόσον η κατάστασή του είναι WT σύμφωνα με την εξέταση.
- MTC: Ο συνολικός αριθμός αντιγράφων του JAK2 πρέπει να είναι αρκετά υψηλός για να είναι δυνατή η ερμηνεία του συγκεκριμένου μάρτυρα. Σε αυτήν την περίπτωση, θα υπολογιστεί το ποσοστό μετάλλαξης του JAK2. Ο μάρτυρας εκτέλεσης επικυρώνεται εφόσον η κατάστασή του είναι υψηλή θετική ως προς τη μετάλλαξη του JAK2.

Ο εσωτερικός μάρτυρας (Internal Control, IC) πρέπει να ενισχυθεί σε όλα τα βυθίσματα που περιέχουν μάρτυρες και πρότυπα ποσοτικοποίησης και πρέπει να εμπίπτει στο προκαθορισμένο εύρος των μαρτύρων.

**Σημείωση:** Η αναφορά που δημιουργείται στο τέλος κάθε εκτέλεσης εμφανίζει τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τους μάρτυρες της εκτέλεσης. Όλα τα μη έγκυρα δεδομένα φέρουν ένδειξη μη εγκυρότητας (Πίνακας 6).

\* Ενεργοποιημένο μόνο για στόχους FAM.

Αν κάποιος μάρτυρας εκτέλεσης δεν συμμορφώνεται, φέρει την ένδειξη «ASSAY\_INVALID». Αν η ένδειξη συνοδεύεται από επισήμανση, η εκτέλεση πρέπει να θεωρείται μη έγκυρη και το πείραμα πρέπει να επαναλαμβάνεται.

Εάν συμμορφώνονται όλοι οι μάρτυρες της εκτέλεσης, το Rotor-Gene AssayManager v2.1 αναλύει τα δείγματα της εξέτασης.

- Ο εσωτερικός μάρτυρας (Internal Control, IC) πρέπει να ενισχυθεί σε όλα τα βυθίσματα που περιέχουν δείγματα και πρέπει να εμπίπτει στο προκαθορισμένο εύρος.
- Ο συνολικός αριθμός αντιγράφων πρέπει να είναι αρκετά υψηλός σε ένα συγκεκριμένο δείγμα για να είναι δυνατή η ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
- Σε αυτήν την περίπτωση, θα υπολογιστεί το ποσοστό μετάλλαξης του JAK2 και θα εμφανιστεί το αποτέλεσμα. Πρέπει να παρατηρηθεί τιμή CT σε κάθε σωληνάριο (WT και MT) προκειμένου να επικυρωθεί ένα δείγμα από το Rotor-Gene AssayManager v2.1 και να είναι έγκυρο το αντίστοιχο αποτέλεσμα.

**Σημείωση:** Αν οι μάρτυρες εκτέλεσης είναι έγκυροι και τα αποτελέσματα δείγματος επίσης έγκυρα, η αναφορά εμφανίζει τον αριθμό αντιγράφων και το ποσοστό μετάλλαξης κάθε δείγματος.

- Ο Πίνακας 6 παραθέτει τις ενδείξεις μη εγκυρότητας δειγμάτων που ενδέχεται να αντιστοιχιστούν σε ένα μεμονωμένο σωληνάριο κατά τη διάρκεια της ανάλυσης από το Rotor-Gene AssayManager v2.1, καθώς και την επεξήγηση της σημασίας κάθε ένδειξης.
- Ο Πίνακας 7 (σελίδα 71) περιλαμβάνει τις προειδοποιητικές ενδείξεις δειγμάτων και την περιγραφή των όρων.

**Πίνακας 6. Ενδείξεις μη εγκυρότητας δειγμάτων και περιγραφή όρων**

<b>Ένδειξη</b>	<b>Περιγραφή</b>
ANALYSIS_FAILED	Ο προσδιορισμός χαρακτηρίζεται μη έγκυρος επειδή η ανάλυση δεν ήταν επιτυχής. Επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN.
ASSAY_INVALID	Ο προσδιορισμός είναι μη έγκυρος διότι τουλάχιστον ένας εξωτερικός μάρτυρας είναι μη έγκυρος.
CONSECUTIVE_FAULT	Ο στόχος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό αυτού του στόχου είναι μη έγκυρος.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Η καμπύλη ενίσχυσης των πρωτογενών δεδομένων εμφανίζει ένα σχήμα που αποκλίνει από την καθιερωμένη συμπεριφορά για αυτόν τον προσδιορισμό. Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα ή εσφαλμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
FLAT_BUMP	Η καμπύλη ενίσχυσης των πρωτογενών δεδομένων παρουσιάζει ένα πλατύ, επίπεδο σχήμα που αποκλίνει από την καθιερωμένη συμπεριφορά για αυτόν τον προσδιορισμό. Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα ή εσφαλμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων (π.χ. εσφαλμένος προσδιορισμός της τιμής $C_T$ ).
INVALID_CALCULATION	Ο υπολογισμός για αυτόν τον στόχο απέτυχε.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	Η τιμή $C_T$ που ανιχνεύτηκε είναι υψηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
MC_IC_LOW_CT (WT)	Η τιμή $C_T$ που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
MC_IC_NO_CT (MT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή $C_T$ για τον εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
MC_IC_NO_CT (WT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή $C_T$ για τον εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
MC_LOW_CN	Ο αριθμός αντιγράφων για τον μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου είναι πολύ χαμηλός.
MC_LOW_PERCENTAGE	Το ποσοστό μετάλλαξης για τον μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου είναι πολύ χαμηλό.
MC_NO_CN	Δεν υπάρχει αριθμός αντιγράφων για τον μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου.
MC_NO_CT (MT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή $C_T$ για τον μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα

**Πίνακας 6. Ενδείξεις μη εγκυρότητας δειγμάτων και περιγραφή όρων (συνέχεια)**

<b>Ένδειξη</b>	<b>Περιγραφή</b>
MC_NO_VALUE	Δεν υπάρχει τιμή για το ποσοστό μετάλλαξης του μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για τον μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για τον μάρτυρα μεταλλαγμένου τύπου με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Η καμπύλη ενίσχυσης υπερβαίνει το κατώφλι πάνω από μία φορά. Δεν μπορεί να προσδιοριστεί μια αδιαμφισβήτητη τιμή C <sub>T</sub> .
NO_BASELINE	Δεν είναι δυνατή η εύρεση αρχικής γραμμής βάσης. Δεν είναι δυνατή η εκτέλεση της επακόλουθης ανάλυσης.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι υψηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα χωρίς μήτρα με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι υψηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα χωρίς μήτρα με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> για τον εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα χωρίς μήτρα με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> για τον εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα χωρίς μήτρα με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα χωρίς μήτρα με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα χωρίς μήτρα με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	Ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> στον μάρτυρα χωρίς μήτρα.
OTHER_TARGET_INVALID	Ένας άλλος στόχος για το ίδιο δείγμα είναι μη έγκυρος.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	Η υπολογισμένη συγκέντρωση για το συγκεκριμένο δείγμα υπερβαίνει το τεχνικό όριο.

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα

**Πίνακας 6. Ενδείξεις μη εγκυρότητας δειγμάτων και περιγραφή όρων (συνέχεια)**

Ένδειξη	Περιγραφή
QS_HIGH_SLOPE (MT)	Υπέρβαση του ανώτατου ορίου της κλίσης μεταλλαγμένου τύπου.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	Υπέρβαση του ανώτατου ορίου της κλίσης άγριου τύπου.
QS_IC_NO_CT (MT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> για τον εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με ένα ή περισσότερα πρότυπα ποσοτικοποίησης μεταλλαγμένου τύπου.
QS_IC_NO_CT (WT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> για τον εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με ένα ή περισσότερα πρότυπα ποσοτικοποίησης άγριου τύπου.
QS_LOW_SLOPE (MT)	Απόκλιση από το κατώτατο όριο της κλίσης μεταλλαγμένου τύπου.
QS_LOW_SLOPE (WT)	Απόκλιση από το κατώτατο όριο της κλίσης άγριου τύπου.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	Απόκλιση από το κατώτατο όριο της τιμής R <sup>2</sup> μεταλλαγμένου τύπου.
QS_LOW_RSQUARED (WT)	Απόκλιση από το κατώτατο όριο της τιμής R <sup>2</sup> άγριου τύπου.
QS_NO_CT (MT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> για ένα ή περισσότερα πρότυπα ποσοτικοποίησης μεταλλαγμένου τύπου.
QS_NO_CT (WT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> για ένα ή περισσότερα πρότυπα ποσοτικοποίησης άγριου τύπου.
QS_UNEXPECTED_ EARLY_CT (MT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για ένα ή περισσότερα πρότυπα ποσοτικοποίησης μεταλλαγμένου τύπου.
QS_UNEXPECTED_ EARLY_CT (WT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για ένα ή περισσότερα πρότυπα ποσοτικοποίησης άγριου τύπου.
RUN_FAILED	Ο προσδιορισμός χαρακτηρίζεται μη έγκυρος λόγω προβλήματος με τον κυκλοποιητή ή τη σύνδεση κυκλοποιητή.
RUN_STOPPED	Ο προσδιορισμός χαρακτηρίζεται μη έγκυρος επειδή έγινε χειροκίνητη διακοπή της εκτέλεσης.
SAMPLE_LOW_CN	Ο συνολικός αριθμός αντιγράφων ενός δείγματος εξέτασης είναι πολύ χαμηλός.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι υψηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με το δείγμα εξέτασης με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα

**Πίνακας 6. Ενδείξεις μη εγκυρότητας δειγμάτων και περιγραφή όρων (συνέχεια)**

<b>Ένδειξη</b>	<b>Περιγραφή</b>
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με το δείγμα εξέτασης με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> για τον εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με το δείγμα εξέτασης με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
SAMPLE_NO_CN	Δεν υπάρχει αριθμός αντιγράφων για το δείγμα εξέτασης.
SAMPLE_NO_VALUE	Δεν υπάρχει τιμή για το ποσοστό μετάλλαξης του δείγματος εξέτασης.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για το δείγμα εξέτασης με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για το δείγμα εξέτασης με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι υψηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με το δείγμα εξέτασης με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με το δείγμα εξέτασης με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> για τον εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με το δείγμα εξέτασης με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
SATURATION	Τα πρωτογενή δεδομένα φθορισμού παρουσιάζουν έντονο κορεσμό πριν από το σημείο καμπής της καμπύλης ενίσχυσης.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Ανιχνεύεται αιχμή στην καμπύλη ενίσχυσης κοντά στην τιμή C <sub>T</sub> .
STEEP_BASELINE	Ανιχνεύεται απότομη άνοδος στην τιμή αναφοράς για τα πρωτογενή δεδομένα φθορισμού στην καμπύλη ενίσχυσης.
STRONG_BASELINE_DIP	Ανιχνεύεται σημαντική πτώση στην τιμή αναφοράς για τα πρωτογενή δεδομένα φθορισμού στην καμπύλη ενίσχυσης.
STRONG_NOISE	Ανιχνεύεται έντονος θόρυβος εκτός της φάσης αύξησης της καμπύλης ενίσχυσης.

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα

**Πίνακας 6. Ενδείξεις μη εγκυρότητας δειγμάτων και περιγραφή όρων (συνέχεια)**

Ένδειξη	Περιγραφή
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Ανιχνεύεται έντονος θόρυβος εντός της φάσης (εκθετικής) αύξησης της καμπύλης ενίσχυσης.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Εντοπίζεται κυματοειδής τιμή αναφοράς για τον φθορισμό των πρωτογενών δεδομένων στην καμπύλη ενίσχυσης.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	Το ποσοστό μετάλλαξης για τον μάρτυρα άγριου τύπου είναι πολύ υψηλό.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι υψηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα άγριου τύπου με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα άγριου τύπου με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
WTC_IC_NO_CT (MT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> για τον εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα άγριου τύπου με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Δεν ανιχνεύτηκε τιμή C <sub>T</sub> για τον εσωτερικό μάρτυρα στο ίδιο σωληνάριο με τον μάρτυρα άγριου τύπου με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.
WTC_NO_CN	Δεν υπάρχει αριθμός αντιγράφων για τον μάρτυρα άγριου τύπου.
WTC_NO_VALUE	Δεν υπάρχει τιμή για το ποσοστό μετάλλαξης του μάρτυρα άγριου τύπου.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για τον μάρτυρα άγριου τύπου με το μείγμα αντίδρασης μεταλλαγμένου τύπου.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Η τιμή C <sub>T</sub> που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερη από το αναμενόμενο για τον μάρτυρα άγριου τύπου με το μείγμα αντίδρασης άγριου τύπου.

**Πίνακας 7. Προειδοποιητικές ενδείξεις δειγμάτων και περιγραφή όρων**

Ένδειξη	Περιγραφή
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Το ποσοστό μεταβολής φθορισμού για το συγκεκριμένο δείγμα σε σχέση με το σωληνάριο δείγματος με τη μεγαλύτερη μεταβολή φθορισμού είναι χαμηλότερο από ένα καθορισμένο όριο.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Η απόδοση αντίδρασης για το συγκεκριμένο δείγμα δεν έχει αγγίξει το καθορισμένο όριο.
SPIKE	Ανιχνεύεται αιχμή στα πρωτογενή δεδομένα κορεσμού της καμπύλης ενίσχυσης αλλά εκτός της περιοχής όπου προσδιορίζεται η τιμή C <sub>T</sub> .

## Περιορισμοί

Το κιτ προορίζεται για επαγγελματική χρήση.

Το προϊόν θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνον από επαγγελματίες με ειδική κατάρτιση και εκπαίδευση σε τεχνικές μοριακής βιολογίας, εξοικειωμένους με την τεχνολογία του προϊόντος. Η διαδικασία χρήσης του προϊόντος περιλαμβάνει εφαρμογή σε περιβάλλον εργαστηρίου μοριακής βιολογίας.

Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit δεν είναι αυτοματοποιημένο προϊόν, ωστόσο, η ανάλυση υποβοηθείται από ειδικό λογισμικό αυτόματης ποσοτικοποίησης των μεταλλάξεων.

Το κιτ θα πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες στο εγχειρίδιο αυτό, μαζί με ένα από τα επικυρωμένα όργανα που αναφέρονται στην παράγραφο «Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται», σελίδα 20.

Πρέπει να δίνεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στην ετικέτα του κουτιού και στις ετικέτες των σωληναρίων. Μη χρησιμοποιείτε ληγμένα συστατικά.

Όλα τα αντιδραστήρια που παρέχονται στο *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit προορίζονται για χρήση αποκλειστικά με τα άλλα αντιδραστήρια που παρέχονται στο ίδιο κιτ. Η μη τήρηση αυτής της οδηγίας, ενδέχεται να επηρεάσει την απόδοση.

Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit έχει επικυρωθεί αποκλειστικά για ανθρώπινο περιφερικό ολικό αίμα με αντιπηκτικό 2K-EDTA που έχει συλλεχθεί από ασθενείς με πιθανολογούμενη ή διαγνωσμένη MYN.

Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit έχει επικυρωθεί αποκλειστικά για χρήση με το QIA Symphony DSP DNA Mini Kit (αρ. κατ. 937236) ή το QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (αρ. κατ. 61104).



Το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit έχει επικυρωθεί αποκλειστικά για χρήση με το Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (για PCR) και το QIASymphony SP (για παρασκευή δειγμάτων).

Οποιαδήποτε μη προβλεπόμενη χρήση αυτού του προϊόντος ή/και τροποποίηση των συστατικών θα επισύρει ακύρωση της ευθύνης της QIAGEN.

Κάθε παραγόμενο διαγνωστικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται στο πλαίσιο των υπόλοιπων κλινικοπαθολογικών ευρημάτων. Η απουσία της μετάλλαξης JAK2 V617F/G1849T δεν αποκλείει την παρουσία άλλων μεταλλάξεων JAK2. Η δοκιμασία μπορεί να αναφέρει ψευδή αρνητικά αποτελέσματα σε περίπτωση πρόσθετων μεταλλάξεων στα νουκλεοτίδια 88504 έως 88622 (16).

Αποτελεί ευθύνη του χρήστη να επικυρώνει την απόδοση του συστήματος για οποιεσδήποτε διαδικασίες χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες απόδοσης της QIAGEN.

# Χαρακτηριστικά απόδοσης

## Απόδοση ανάλυσης

### Όριο τυφλού

Το όριο τυφλού (LOB) προσδιορίστηκε σύμφωνα με το πρότυπο CLSI/NCCLS EP17-A2, σε 30 δείγματα ολικού αίματος από υγιείς δότες με κατάσταση JAK2 άγριου τύπου (WT) και χρήση τριών παρτίδων αντιδραστηρίων (120 μετρήσεις/παρτίδα).

Τα αποτελέσματα LOB συνοψίζονται στον Πίνακα 8. Αντιστοιχούν στην αναμενόμενη τιμή σε φυσιολογικό πληθυσμό με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

**Πίνακας 8. Σύνοψη των αποτελεσμάτων LOB**

	Μέτρηση LOB	Τελικό όριο τυφλού
Παρτίδα 1	0%	
Παρτίδα 2	0%	0%
Παρτίδα 3	0%	

### Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LOD ή αναλυτική ευαισθησία) προσδιορίστηκε μέσω της «προσέγγισης probit» που περιγράφεται στο πρότυπο CLSI/NCCLS EP17-A2. Σε αυτήν τη μελέτη, αναλύθηκαν 6 χαμηλά επίπεδα μετάλλαξης για 3 ανεξάρτητα δείγματα (DNA ολικού αίματος MYN εμβολιάστηκαν σε DNA ολικού αίματος άγριου τύπου (WT)), με 3 παρτίδες, 60 μετρήσεις ανά δείγμα και ανά μετάλλαξη. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπέδειξαν αναλυτική ευαισθησία 0,042% της μετάλλαξης JAK2 V617F.

Τα αποτελέσματα LOD συνοψίζονται στον Πίνακα 9.

**Πίνακας 9. Σύνοψη των αποτελεσμάτων LOD**

	<b>Μέτρηση LOD</b>	<b>Τελικό όριο ανίχνευσης</b>
Παρτίδα 1	0,041%	
Παρτίδα 2	0,029%	0,042%
Παρτίδα 3	0,042%	

## Όριο ποσοτικοποίησης

Ο ορισμός και ο προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (Limit of quantitation, LOQ) βασίστηκε στην κατευθυντήρια οδηγία του CLSI/NCCLS EP17-A2. Ως Limit of quantitation (LOQ) ορίστηκε το κατώτατο επίπεδο του ποσοστού μετάλλαξης JAK2 V617F που μπορεί να διακριθεί με ακρίβεια από το Limit of quantitation (LOQ) του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (κίνδυνος σφάλματος  $\alpha = 0,05$ ). Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τη μελέτη επαναληψιμότητας ενός κέντρου για τον υπολογισμό του Limit of quantitation (LOQ) του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποδεικνύουν Limit of quantitation (LOQ) 0,233% της μετάλλαξης JAK2 V617F.

Στο πλαίσιο της μοριακής παρακολούθησης της νόσου αυτό υπονοεί ότι αν το μετρούμενο ποσοστό της μετάλλαξης JAK2 V617F είναι κάτω από 0,233% σε μια δεδομένη χρονική στιγμή, η μείωση του φορτίου αλληλόμορφων JAK2 V617F δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με αξιοπιστία την επόμενη χρονική στιγμή.

## Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα της ποσοτικοποίησης της μετάλλαξης JAK2 σε ασθενείς MYN αξιολογήθηκε σύμφωνα με το πρότυπο CLSI/NCCLS EP06AE, με μία παρτίδα *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και εξέταση σε 11 επίπεδα μετάλλαξης για πέντε διαφορετικά εισαγόμενα DNA. Η ποσοτικοποίηση του φορτίου μετάλλαξης JAK2 σε δείγματα MYN είναι γραμμική, δηλ. το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit μπορεί να ποσοτικοποιεί δείγματα από την τιμή LOD σε μετάλλαξη 100%, που αντιστοιχεί στις αναμενόμενες τιμές του πληθυσμού πασχόντων, εφόσον η συγκέντρωση του δείγματος του ποσοτικοποιημένου DNA είναι κοντά στην τιμή 10 ng/μl (μεταξύ 5 και 20 ng/μl).

## Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα

Το σχέδιο της μελέτης ακρίβειας ενός κέντρου πληροί τις προϋποθέσεις του προτύπου CLSI/NCCLS EP5-A3. Η εξέταση διενεργήθηκε σε 11 επίπεδα μετάλλαξης, από 0,07% έως 72,67%, με χρήση διαδοχικών αραιώσεων κλινικού δείγματος από ασθενή MYN. Για κάθε επίπεδο μετάλλαξης, προέκυψαν 108 μετρήσεις από τρεις χειριστές σε διάστημα 27 ημερών (δύο επαναλήψεις ανά εκτέλεση και δύο εκτελέσεις ανά ημέρα) με χρήση τριών παρτίδων *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και τριών οργάνων Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Η ακρίβεια για το επίπεδο 100% εκφράζεται με σύγκριση προς την ακρίβεια που προσδιορίζεται για το επίπεδο 72,67%, βασισμένη σε αναλύσεις τάσης υποστηριζόμενες από πρόσθετα δεδομένα που προκύπτουν σε δείγμα 100% JAK2 V617F από DNA της κυτταρικής σειράς MUTZ-8 (38 μετρήσεις).

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 10.

**Πίνακας 10. Αποτελέσματα ακρίβειας: επαναληψιμότητα (μελέτη ενός κέντρου)**

Δείγμα	Μέσο ποσοστό μετάλλαξης JAK2	SD <sub>R+</sub>	SD <sub>RUN++</sub>	SD <sub>TOTAL+++</sub>	CV <sub>TOTAL</sub>
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: Τυπική απόκλιση

R+: Επαναληψιμότητα

RUN++: Ακρίβεια μεταξύ εκτελέσεων

TOTAL+++ : Συνολική ακρίβεια (συμπεριλαμβανομένης της ακρίβειας μεταξύ οργάνων, μεταξύ χειριστών και μεταξύ παρτίδων)

CV<sub>TOTAL</sub>: Συντελεστής μεταβλητότητας για τη συνολική ακρίβεια σε ποσοστό

ND: Δεν προσδιορίζεται

Το σχέδιο της μελέτης ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων πληροί τις προϋποθέσεις του προτύπου CLSI/NCCLS EP5-A3. Στη μελέτη συμμετείχαν τέσσερα κέντρα (στη Γαλλία, τη Γερμανία και δύο κέντρα στις ΗΠΑ). Η εξέταση διενεργήθηκε σε επτά επίπεδα μετάλλαξης, από 1,21% έως 67,64%, με χρήση αραιώσεων της κυτταρικής σειράς MUTZ-8 σε ολικό αίμα από υγιείς δότες (δηλ. τεχνητά δείγματα). Κάθε κέντρο διενέργησε τρεις εκτελέσεις εκχύλισης DNA με χρήση του οργάνου QIASymphony SP και μιας μοναδικής παρτίδας QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Κάθε εκχύλισμα DNA εξετάστηκε σε οκτώ εκτελέσεις qPCR (δύο εκτελέσεις ανά ημέρα και ανά κέντρο σε τέσσερις μη διαδοχικές ημέρες) με χρήση μιας μοναδικής παρτίδας *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και οδήγησε σε 96 αναμενόμενες μετρήσεις ανά δείγμα σε όλα τα κέντρα.

Το δείγμα L2 ήταν μη έγκυρο σε μία εκτέλεση εκχύλισης που οδήγησε σε συνολικό αριθμό 88 εξετάσεων qPCR αντί 96. Επίσης, μία εκτέλεση qPCR ήταν μη έγκυρη και οδήγησε σε τρεις μη έγκυρες εξετάσεις για όλα τα δείγματα (εκτός από το L2, δηλ. 2 μη έγκυρα αποτελέσματα). Επιπλέον, το δείγμα L7 ήταν μη έγκυρο σε μία εκτέλεση qPCR και το L4 ήταν μη έγκυρο σε δύο εκτελέσεις qPCR και οδήγησε σε δύο επιπλέον μη έγκυρες εξετάσεις (Πίνακας 11).

Η ακρίβεια για το επίπεδο 100% εκφράζεται με σύγκριση προς την ακρίβεια που προσδιορίζεται για το επίπεδο 67,64%, βασισμένη σε αναλύσεις τάσης υποστηριζόμενες από πρόσθετα δεδομένα που προκύπτουν σε δείγμα 100% JAK2 V617F από DNA της κυτταρικής σειράς MUTZ-8 (38 μετρήσεις).

**Πίνακας 11. Αποτελέσματα ακρίβειας: αναπαραγωγιμότητα (μελέτη μεταξύ εργαστηρίων)**

Δείγμα	Σύνολο εξετάσεων	Σύνολο μη έγκυρων εξετάσεων	Μέση τιμή JAK2%MT	Εντός εκτέλεσης, SD, %CV	Μεταξύ εκτελέσεων εντός της ημέρας, SD, %CV	Μεταξύ ημερών, SD, %CV	Μεταξύ κέντρων, SD, %CV	Σύνολο, SD, %CV
L0	Δ/Ε	Δ/Ε	100	Δ/Ε	Δ/Ε	Δ/Ε	Δ/Ε	≤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:** Ποσοστό μετάλλαξης JAK2, **SD:** Τυπική απόκλιση, **CV:** Συντελεστής μεταβλητότητας σε ποσοστό, **Δ/Ε:** Δεν εφαρμόζεται

Διενεργήθηκε πρόσθετη μελέτη μεταξύ εργαστηρίων σε τρία κέντρα εξέτασης (ένα στην Ευρώπη και δύο στις ΗΠΑ), σε τέσσερα δείγματα ολικού αίματος από ασθενείς MYN (δηλ. κλινικά δείγματα). Κάθε κέντρο διενέργησε τρεις εκτελέσεις DNA. Κάθε εκχύλισμα DNA εξετάστηκε σε 12 εκτελέσεις qPCR (μία επανάληψη ανά εκτέλεση ανά δείγμα, δύο εκτελέσεις ανά ημέρα ανά χειριστή σε κάθε κέντρο - συμμετείχαν δύο χειριστές ανά κέντρο - σε τρεις μη διαδοχικές ημέρες) σε ένα όργανο Rotor-Gene Q MDx με χρήση μίας παρτίδας *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit*. Σε κάθε δείγμα προέκυψαν 36 μετρήσεις (Πίνακας 12).

**Πίνακας 12. Αποτελέσματα πρόσθετης μελέτης μεταξύ εργαστηρίων**

Δείγμα	Αριθ.	Μέση τιμή JAK2%MT	Εντός εκτέλεσης, SD, %CV	Μεταξύ εκτελέσεων εντός της ημέρας, SD, %CV	Μεταξύ ημερών, SD, %CV	Μεταξύ κέντρων, SD, %CV	Σύνολο, SD, %CV
Δείγμα 1	36	95,19	0,995, 1,04	0,000, 0,00	0,541, 0,57	0,000, 0,00	1,130, 1,19,
Δείγμα 2	36	22,83	3,988, 17,47	0,000, 0,00	1,707, 7,48	1,552, 6,80	4,501, 19,72
Δείγμα 3	36	14,44	2,257, 15,63	1,398, 9,68	0,000, 0,00	1,422, 9,84	2,890, 20,01
Δείγμα 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:** Ποσοστό μετάλλαξης JAK2, **Αριθ.:** Αριθμός μετρήσεων, **SD:** Τυπική απόκλιση, **CV:** Συντελεστής μεταβλητότητας σε ποσοστό

## Παρεμβαλλόμενες ουσίες (ειδικότητα ανάλυσης)

Το σχέδιο της μελέτης πληροί τις προϋποθέσεις του προτύπου EP7-A3 «Interference Testing in clinical Chemistry» (Δοκιμασίες παρεμβολών στην κλινική χημεία) του NCCLS. Επιλέχθηκαν συνολικά 19 ουσίες που ενδέχεται να περιέχονται σε δείγματα αίματος για τη δυναμική τους επίδραση στην PCR (βουσουλφάνη, υδροβρωμική σιταλοπράμη, ημιυδρική υδροχλωρική παροξετίνη, υδροχλωρική σετραλίνη, υδροχλωρική φλουοξετίνη, ακεταμινοφαίνη [παρακεταμόλη], μη συζευγμένη χολερυθρίνη, καλιούχο 2K EDTA και 3K EDTA, EDTA νατρίου, Hgb [ανθρώπινη], τριγλυκερίδια, διένυδρη λισινοπρίλη, υδροξουρία, ακετυλοσαλικυλικό οξύ, σαλικυλικό οξύ, θειοτέπα, αναγρελίδη, ιντερφερόνη άλφα 2β).

Αξιολογήθηκαν επίσης ουσίες από τη διαδικασία εκχύλισης DNA (QSL1, QSB1, QSW1, QSW2 και PK από το QIASymphony DSP DNA Blood Mini Kit, QIAGEN Protease, αιθανόλη, AW1 και AW2 από το QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit).

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν δεν έδειξαν επιδράσεις παρεμβολής από τις ουσίες αυτές.

**Πίνακας 13. Παρεμβαλλόμενες ουσίες**

<b>Εξεταζόμενη ουσία</b>	<b>Συγκέντρωση δοκιμασίας</b>
Μη συζευγμένη χολερυθρίνη	150,3 µg/mL
Αιμοσφαιρίνη [ανθρώπινη]	2.000 µg/mL
Τριγλυκερίδια	30.000 µg/mL
Βουσουφάνη	38,4 µg/mL
Υδροβρωμική σιταλοπράμη	0,75 µg/mL
Ημιυδρική υδροχλωρική παροξετίνη	1,14 µg/mL
Υδροχλωρική σεραλίνη	0,67 µg/mL
Υδροχλωρική φλουοξετίνη	3,87 µg/mL
Ακεταμινοφαίνη [παρακεταμόλη]	200,7 µg/mL
Διένυδρη λισινοπρίλη	0,33 µg/mL
Υδροξουρία	28,2 µg/mL
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	651,6 µg/mL
Σαλικυλικό οξύ	0,6 µg/mL
Θειοτέπτα	48 µg/mL
Αναγρελίδη	6 µg/mL
Ιντερφερόνη άλφα 2β*	1,8 MU/L
Καλιούχο EDTA (2K-EDTA)	2X (3.600 µg/mL)
Καλιούχο EDTA (3K-EDTA) †	1X (1.800 µg/mL), 3X (5.400 µg/ml)

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα



Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα  
**Πίνακας 13. Παρεμβαλλόμενες ουσίες (συνέχεια)**

Εξεταζόμενη ουσία	Συγκέντρωση δοκιμασίας
EDTA νατρίου (2Na-EDTA) †	1X (3.000 µg/ml), 3X (9.000 µg/ml)
QSL1	2% του συνολικού όγκου δείγματος
QSB1	2% του συνολικού όγκου δείγματος
QSW1	2% του συνολικού όγκου δείγματος
QSW2	2% του συνολικού όγκου δείγματος
proteinase K (PK) ‡	2% του συνολικού όγκου δείγματος
proteinase K (PK) ‡	2 φορές ο αναμενόμενος υπολειπόμενος όγκος μετά τη διεργασία εκχύλισης 3 φορές ο αναμενόμενος υπολειπόμενος όγκος μετά τη διεργασία εκχύλισης
QIAGEN Protease	1,29E-05% του συνολικού όγκου δείγματος
Αιθανόλη (EtOH)	1,29E-03% του συνολικού όγκου δείγματος
Buffer AW1	1,00 E-01% του συνολικού όγκου δείγματος
Buffer AW2	1,00% του συνολικού όγκου δείγματος

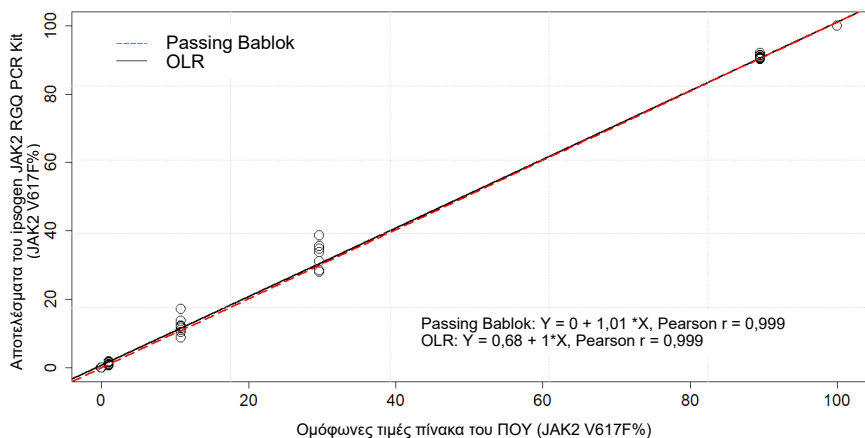
\* Η συνιστώμενη δόση για ασθενείς PV είναι 3 MU, η οποία θεωρείται ότι κατανέμεται σε 5 L αίματος (σε άτομο 80 Kg), με συνεπαγόμενη συγκέντρωση 0,6 MU/L. Σύμφωνα με τις συστάσεις του προτύπου EP7-A2 του NCCLS, εξετάστηκε τριπλάσια συγκέντρωση, δηλ. 1,8 MU/L.

† 1 φορά η συγκέντρωση που ορίζει ο προμηθευτής

‡ Η PK προκαλεί επίδραση παρεμβολής όταν εξετάζεται στο 2% του συνολικού όγκου δείγματος (η οποία θεωρείται απίθανη). Περαιτέρω εξέταση επιβεβαίωσε ότι η PK απομακρύνεται κατά τη διαδικασία εκχύλισης: δεν αναμένεται παρεμβολή σε κανονικές συνθήκες χρήσης.

## Εξέταση του διεθνούς πίνακα αναφοράς του ΠΟΥ για γονιδιωματική JAK2 V617F (NIBSC, κωδικός πίνακα 16/120)

Ο 1ος διεθνής πίνακας αναφοράς του ΠΟΥ για γονιδιωματική JAK2 V617F που δημιουργήθηκε από το National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, κωδικός πίνακα 16/120), εξετάστηκε με χρήση τριών παρτίδων του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (τρεις επαναλήψεις ανά επίπεδο του πίνακα αναφοράς και ανά παρτίδα αντιδραστηρίων). Τα πειράματα διενεργήθηκαν σε τρεις ημέρες από έναν χειριστή, με χρήση ενός οργάνου Rotor-Gene Q 5plex HRM. Η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και των ομόφωνων τιμών που δημοσιεύονται στις οδηγίες χρήσης του πίνακα αναφοράς αξιολογήθηκε με χρήση μιας συνήθους γραμμικής παλινδρόμησης [κλίση: 1,003, 95% ΔΕ (0,997, 1,010) – τεταγμένη: 0,677, 95% ΔΕ (0,212, 1,289)] και παλινδρόμηση Passing-Bablok [κλίση: 1,01, 95% ΔΕ (1,00, 1,021) – τεταγμένη: 0,00, 95% ΔΕ (-0,02, 0,010)] (Εικόνα 22). Η συμφωνία επιβεβαιώνεται, καταδεικνύοντας την καταλληλότητα του kit να παρέχει δεδομένα για την JAK2 V617F που συμβαδίζουν με άλλες διαγνωστικές τεχνικές συχνής χρήσης.



**Εικόνα 22. Συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων του ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit και των ομόφωνων τιμών του διεθνούς πίνακα αναφοράς του ΠΟΥ για γονιδιωματική JAK2 V617F (NIBSC, κωδικός πίνακα 16/120).** Η συμφωνία αξιολογήθηκε με χρήση συνήθους γραμμικής παλινδρόμησης (Ordinary Linear Regression, OLR) και παλινδρόμησης Passing Bablok. Ο πίνακας περιλαμβάνει επτά επίπεδα JAK2 V617F: 100%, 89,5%, 29,6%, 10,8%, 1,00%, 0,03% και 0%. Οι ομόφωνες τιμές του ΠΟΥ προσδιορίστηκαν με χρήση διαφόρων τεχνικών συχνής χρήσης στο πλαίσιο μιας διεθνούς συλλογικής μελέτης. Οι τιμές αναφοράς που αποδίδονται σε κάθε επίπεδο JAK2 V617F % είναι διάμεσες τιμές (περισσότερες πληροφορίες στη διεύθυνση <https://www.nibsc.org>).

## Ορθότητα και ακρίβεια

Η ορθότητα των μετρήσεων σχετίζεται αντιστρόφως με το συστηματικό σφάλμα μέτρησης (SE ή απόκλιση). Η απόκλιση υπολογίστηκε με βάση την κατευθυντήρια οδηγία EP09c του NCCLS για κάθε επίπεδο JAK2 V617F% του πίνακα αναφοράς, για κάθε παρτίδα αντιδραστηρίων, καθώς και σε όλες τις παρτίδες αντιδραστηρίων (Πίνακας 14), με χρήση δεδομένων από την προαναφερόμενη μελέτη. Οι ανώτατες τιμές απόκλισης προέκυψαν με την παρτίδα 2 του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Ακρίβεια είναι η εγγύτητα της συμφωνίας ανάμεσα σε ένα αποτέλεσμα εξέτασης και την αποδεκτή τιμή αναφοράς (στη συγκεκριμένη περίπτωση, την τιμή που αντιστοιχίζεται σε κάθε επίπεδο JAK2 V617F% του πίνακα του ΠΟΥ). Η ακρίβεια λαμβάνει υπόψη και την ορθότητα και την πιστότητα, και είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το συνολικό σφάλμα, και υπολογίζεται σύμφωνα με τον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Απόκλιση και σφάλμα μέτρησης

Πίνακας ΠΟΥ Κωδικός φύσιγγας Τιμή αναφοράς	Παρτίδα <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Απόκλιση (SE) ανά παρτίδα [95% ΔΕ]	Απόκλιση (SE) συνολικά [95% ΔΕ]	Συνολικό σφάλμα (Ακρίβεια)
15/172 0%	1	0,000 [Δ/Ε]	0,001 [-0,001, 0,004]	0,010
	2	0,003 [-0,011, 0,018]		
	3	0,000 [Δ/Ε]		
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]		

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα  
**Πίνακας 14. Απόκλιση και σφάλμα μέτρησης (συνέχεια)**

Πίνακας ΠΟΥ Κωδικός φύσιγγας Τιμή αναφοράς	Παρτίδα <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Απόκλιση (SE) ανά παρτίδα [95% ΔΕ]	Απόκλιση (SE) συνολικά [95% ΔΕ]	Συνολικό σφάλμα (Ακρίβεια)
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 [Δ/Ε]		
	3	-0,013 [-0,028, 0,001]		

**SE:** Συστηματικό σφάλμα ή απόκλιση, δηλ. η διαφορά ανάμεσα στον μέσο όρο των μεμονωμένων μετρήσεων που προκύπτουν από το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit ( $\bar{V}_{\text{JAK2 Kit}}$ ) και την ομόφωνη τιμή του πίνακα αναφοράς του ΠΟΥ ( $V_{\text{Ref}}$ ).

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

Το συνολικό σφάλμα (Total Error, TE) υπολογίζεται με τον τύπο  $TE = \sqrt{s^2 + SE^2}$ , όπου s είναι η τυπική απόκλιση (τυχαίο σφάλμα).

95% ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης 95%

**Δ/Ε:** δεν εφαρμόζεται

## Ακρίβεια ανάλυσης

Σκοπός της μελέτης ήταν η επικύρωση της ακρίβειας ανάλυσης του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit σε κανονικές συνθήκες χρήσης με κλινικά δείγματα από συμμετέχοντες με πιθανολογούμενη μυελούπερπλαστική νεοπλασία. Η μελέτη διενεργήθηκε σε δείγματα gDNA που εκχυλίστηκαν από συνολικά 473 δοκίμια: 276 με πιθανολογούμενη PV, 98 με ET και 99 με PMF. Η κατάσταση JAK2 V617F των δειγμάτων των ασθενών που προέκυψε με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit συγκρίθηκε με την κατάσταση JAK2 V617F που προέκυψε με τη μέθοδο αναφοράς για τον προσδιορισμό κατάστασης JAK2, δηλ., με ανεξάρτητα επικυρωμένη αμφίδρομη αλληλούχιση (BDS). Καθώς το LoD του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit είναι 0,042% της JAK2 V617F, η κατάσταση JAK2 V617F ενός δείγματος ασθενούς που εξετάζεται με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit είναι θετική αν έχει τιμή μεγαλύτερη ή ίση του ορίου και αρνητική αν έχει τιμή μικρότερη του ορίου. Από τα 473 δοκίμια, 22 δοκίμια ήταν θετικά για JAK2 με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit ενώ ήταν αρνητικά με την BDS.

Η συνολική συμφωνία είναι 95,35% (451/473 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 93,04%, 97,06%). Η θετική συμφωνία ήταν 100% (165/165 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 97,79%, 100%) και η αρνητική συμφωνία ήταν 92,86% (286/308 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 89,39%, 95,47%). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

**Πίνακας 15. Συμφωνία μεταξύ του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και της αμφίδρομης αλληλούχισης Sanger σε πληθυσμό MYN (συνδυαστικοί πληθυσμοί ET, PMF και PV)**

		Αμφίδρομη αλληλούχιση Sanger		
		Θετική για JAK2 V617F	Αρνητική JAK2 V617F	Σύνολο
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Θετική για JAK2 V617F	165	22	187
	Αρνητική για JAK2 V617F	0	286	286
	Σύνολο	165	308	473

## Αξιολόγηση της ακρίβειας ανάλυσης σε κοόρτες MYN

Η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων που προκύπτουν για τη μετάλλαξη JAK2 V617F με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και την αλληλούχιση Sanger (BDS) σε συμμετέχοντες με ET, PMF και PV παρέχονται ξεχωριστά:

- Για την ET, η συνολική συμφωνία είναι 89,8% (88/98 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 82,03–95,0%), η θετική συμφωνία είναι 100% (43/43 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 91,78–100%) και η αρνητική συμφωνία είναι 81,82% (45/55 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 69,1–90,92%).
- Για την PMF, η συνολική συμφωνία είναι 93,94% (93/99 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 87,27–97,74%), η θετική συμφωνία είναι 100% (51/51 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 93,02–100%) και η αρνητική συμφωνία είναι 87,5% (42/48 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 74,75–95,27%).
- Για την PV, η συνολική συμφωνία είναι 97,83% (270/276 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 95,33–99,2%), η θετική συμφωνία είναι 100% (71/71 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 94,94–100%) και η αρνητική συμφωνία είναι 97,07% (199/205 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 93,74–98,92%).

Τα δοκίμια με ασύμφωνα αποτελέσματα εμφάνισαν επίπεδα μετάλλαξης κάτω από τη δυνατότητα ανίχνευσης της BDS (περίπου 10%). Καθώς η αλληλούχιση Sanger δεν είναι εξίσου ευαίσθητη με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit που μπορεί να αναφέρει χαμηλές τιμές έως και 0,042% για JAK2 V617F (δηλ. την τιμή LoD), διενεργήθηκε ξεχωριστή μελέτη με χρήση μιας επικυρωμένης μεθόδου αλληλούχισης επόμενης γενιάς Next-generation sequencing (NGS) για την ανίχνευση αλληλόμορφου JAK2 V617F στα 15/22 ασύμφωνα δείγματα (εννέα ET, πέντε PMF και ένα PV), καθώς και σε ένα τυχαία επιλεγμένο σύνολο 22 θετικών και αρνητικών για JAK2 V617F δοκιμίων που παρουσίαζαν συμφωνία. Η κατάσταση JAK2 V617F των δειγμάτων ασθενών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Next-generation sequencing (NGS) βάσει του ορίου της για την αναλυτική ευαισθησία (δηλ. μεταξύ 1% και 2% της JAK2 V617F). Συνεπώς, η κατάσταση JAK2 V617F ενός δείγματος ασθενούς ήταν θετική αν η μετάλλαξη JAK2 V617F ανιχνευόταν από τη μέθοδο Next-generation sequencing (NGS) και η κατάσταση JAK2 V617F ήταν αρνητική αν η μετάλλαξη JAK2 V617F δεν ανιχνευόταν.



Και τα 15 ασύμφωνα δοκίμια αναφέρθηκαν θετικά από την Next-generation sequencing (NGS), σε συμφωνία με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Όλα τα δείγματα που παρουσίαζαν συμφωνία αναφέρθηκαν ομοίως με την Next-generation sequencing (NGS) και σε συμφωνία με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και την BDS. Τα υπόλοιπα 7 δείγματα θεωρήθηκαν ασύμφωνα καθώς δεν υπήρξαν διαθέσιμα δεδομένα Next-generation sequencing (NGS) για αυτά.

## Συμπέρασμα της μελέτης ακρίβειας ανάλυσης

Ύστερα από επαναταξινόμηση των ασύμφωνων περιπτώσεων με χρήση των αποτελεσμάτων Next-generation sequencing (NGS), το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit κατέδειξε 98,3% ως προς την ακρίβεια της ανίχνευσης αλληλόμορφου JAK2 V617F σε δοκίμια από συμμετέχοντες MYN με επίπεδα JAK2 V617F  $\geq 0,042\%$  (δηλ. την τιμή LoD).

## Κλινική απόδοση

Η κλινική απόδοση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit στη διάγνωση PV αξιολογήθηκε κατά τη διάρκεια πολυκεντρικής, διεθνούς, προοπτικής παρεμβατικής μελέτης.

Σκοπός της μελέτης ήταν να καταδείξει την ακρίβεια του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit στην ανίχνευση της μετάλλαξης V617F σε συμμετέχοντες με πιθανολογούμενη PV. Ως αναφορά για τον προσδιορισμό της κατάστασης JAK2 χρησιμοποιήθηκε μια ανεξάρτητα επικυρωμένη αμφίδρομη μέθοδος αλληλούχισης (BDS).

Η ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2 V617F εισήχθηκε πρώτη φορά στα κριτήρια αναφοράς του ΠΟΥ το 2008 για τη διάγνωση BCR-ABL αρνητικής MYN και η παρουσία αυτής της μετάλλαξης αποτελεί βασικό κριτήριο για τη διαγνωστική επιβεβαίωση (17).

Η παρουσία της JAK2 V617F είναι μία από τα δύο κύρια διαγνωστικά κριτήρια [η PV επιβεβαιώνεται αν πληρούνται δύο κύρια κριτήρια και ένα δευτερεύον ή το πρώτο κύριο κριτήριο και δύο δευτερεύοντα κριτήρια σύμφωνα με τον ΠΟΥ 2008\*, (για περισσότερες λεπτομέρειες ανατρέξτε στην παραπομπή 17)].

Στόχος ήταν να αξιολογηθεί η ειδικότητα, η ευαισθησία, η θετική προγνωστική τιμή Positive predictive value (PPV), η αρνητική προγνωστική τιμή Negative predictive value (NPV) και ο λόγος πιθανοτήτων για διαγνώσεις που τεκμηριώνονται με τα διαγνωστικά κριτήρια του 2008 του ΠΟΥ\* με χρήση του προσδιορισμού κατάστασης JAK2 V617F είτε με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit με τιμή αποκοπής 0,042% για τη θετικότητα (δηλ. το LoD του kit) είτε με την BDS.

Η μελέτη διενεργήθηκε σε εννέα ερευνητικά κέντρα στις Ηνωμένες Πολιτείες (επτά εγγεγραμμένοι συμμετέχοντες), 12 ερευνητικά κέντρα στη Γαλλία (12 εγγεγραμμένοι συμμετέχοντες) και εννέα ερευνητικά κέντρα στην Ιταλία (πέντε εγγεγραμμένοι συμμετέχοντες). Οι συμμετέχοντες ελέγχθηκαν και επιλέχθηκαν με βάση τα κριτήρια συμπεριληψιμότητας που υποδείκνυαν διάγνωση PV. Όλοι οι εγγεγραμμένοι συμμετέχοντες έκαναν εξετάσεις αίματος και με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και με τη δοκιμασία αναφοράς, τον προσδιορισμό με αμφίδρομη αλληλούχιση (BDS) της JAK2 V617F και της κατάστασης του εξόνιου 12 του JAK2. Οι συμμετέχοντες με κλινικά χαρακτηριστικά συμβατά με τη διάγνωση PV (όπως αυξημένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και μειωμένα επίπεδα ερυθροποιητίνης [EPO]), αλλά με προσδιορισμό BDS αρνητικό για JAK2 V617F και εξόνιο 12, και οι συμμετέχοντες με προσδιορισμό BDS θετικό για JAK2 V617F και εξόνιο 12 και φυσιολογικά ή υψηλότερα επίπεδα EPO, υποβλήθηκαν σε βιοψία μυελού των οστών με ιστολογική και κυτταρογενετική ανάλυση, σύμφωνα με τον διαγνωστικό αλγόριθμο του 2008 του ΠΟΥ για τα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα. Η τελική διάγνωση (PV ή μη PV) τεκμηριώθηκε με βάση τα αποτελέσματα των μη δοκιμαζόμενων διαδικασιών της μελέτης (δηλ., των κριτηρίων του 2008 του ΠΟΥ με προσδιορισμό της μετάλλαξης JAK2 με χρήση του προσδιορισμού αναφοράς BDS).

Συνολικά 216 συμμετέχοντες ορίστηκαν ως ο αξιολογήσιμος πληθυσμός που περιλαμβάνει όλους τους συμμετέχοντες που πληρούν με επιτυχία τα κριτήρια κλινικού ελέγχου και τα κριτήρια της ανάλυσης με χρήση του προσδιορισμού αναφοράς BDS. 67 επιπλέον συμμετέχοντες δεν χαρακτηρίστηκαν αξιολογήσιμοι για τις αιτίες που αναφέρονται στον Πίνακα 16 (ορισμένοι συμμετέχοντες δεν κρίθηκαν αξιολογήσιμοι για περισσότερους από έναν λόγους).

\* Καθώς η μελέτη κλινικής απόδοσης ξεκίνησε πριν την επικαιροποίηση των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ του 2016, χρησιμοποιήθηκαν τα διαγνωστικά κριτήρια του ΠΟΥ του 2008 για τη διεξαγωγή της μελέτης κλινικής απόδοσης.

**Πίνακας 16. Αιτίες αποκλεισμού του εγγεγραμμένου πληθυσμού**

Αιτία	Αριθμός συμμετεχόντων
Δεν πληρούν με επιτυχία τα κριτήρια συμπεριληψιμότητας ή αποκλεισμού.	9
Δεν υπάρχουν αποτελέσματα EPO.	22
Δεν υπάρχει βιοψία MO, εφόσον απαιτείται για τη διάγνωση PV.	26
Θετικοί για JAK2 V617F με BDS και EPO ορού εντός φυσιολογικών ορίων.	15
Θετικοί για εξόνιο 12 του JAK2 με BDS και EPO ορού εντός φυσιολογικών ορίων.	1
Αρνητικοί για JAK2 V617F με BDS και EPO ορού σε μη φυσιολογικά χαμηλό επίπεδο.	10
Οι ασθενείς δεν ολοκλήρωσαν τη μελέτη ή/και δεν υπάρχει τελική διάγνωση PV.	15

Στη μελέτη διενεργήθηκαν συνολικά 221 αξιολογήσεις κατάστασης JAK2 V617F (συμπεριλαμβανομένων πέντε επαναληπτικών δοκιμών) με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit στο όργανο Rotor-Gene Q MDx (Πίνακας 17, Πίνακας 18).

**Πίνακας 17. Σύνοψη των αποτελεσμάτων των εξετάσεων *ipsogen* JAK2 RGQ PCR (αξιολογήσιμος πληθυσμός)**

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Σύνολο (Αριθ.=216)
Θετικοί για JAK2 V617F ( $\geq$ LoD δηλ. 0,042%)	54
Αρνητικοί για JAK2 V617F ( $<$ LoD δηλ. 0,042%)	162

**Πίνακας 18. Σύνοψη των αποτελεσμάτων των εξετάσεων *ipsogen* JAK2 RGQ PCR – Πληθυσμός θετικός για JAK2 V617F (μεταξύ του αξιολογήσιμου πληθυσμού)**

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Σύνολο (Αριθ.=54)
Μέση τιμή JAK2 %MT που προκύπτει	51,54
Ελάχιστη τιμή JAK2 %MT που προκύπτει	0,14
Μέγιστη τιμή JAK2 %MT που προκύπτει	93,43

**Αριθ.:** Αριθμός δειγμάτων, **JAK2 %MT:** Ποσοστό μετάλλαξης JAK2

## Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μελέτης επικύρωσης: έκβαση απόδοσης

Η σύγκριση των τελικών διαγνώσεων PV και μη PV κατέδειξε ότι οι δύο μέθοδοι διάγνωσης ήταν σύμφωνες: 94,6% των συμμετεχόντων (53/56 συμμετέχοντες) που διαγνώστηκαν με PV από τον ερευνητή διαγνώστηκαν επίσης με PV με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ. Ομοίως, 95,6% των συμμετεχόντων (153/160 συμμετέχοντες) που δεν διαγνώστηκαν με PV από τον ερευνητή, επίσης δεν διαγνώστηκαν με PV με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ (Πίνακας 19, Πίνακας 20).

Η κατάσταση μετάλλαξης JAK2 V617F και εξονίου 12 με BDS και η κατάσταση μετάλλαξης JAK2 V617F με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit συνοψίζονται στον Πίνακα 19. Η σύγκριση των διαγνώσεων PV και μη PV που τεκμηριώνονται με χρήση της κάθε μεθόδου εξέτασης, περιλαμβάνεται στον Πίνακα 19.

**Πίνακας 19. Κατάσταση μετάλλαξης (JAK2 V617F με αμφίδρομη αλληλούχιση, εξόνιο 12 του JAK2 με αμφίδρομη αλληλούχιση και *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit) ανά κατάσταση PV (αξιολογήσιμος πληθυσμός)**

Μεταβλητή	PV (Αριθ.=56)	Μη PV (Αριθ.=160)	Σύνολο (Αριθ.=216)
Κατάσταση μετάλλαξης JAK2 V617F με BDS			
Θετικοί	48 (85,7%)	1 (0,6%)	49 (22,7%)
Αρνητικοί	8 (14,3%)	159 (99,4%)	167 (77,3%)
Κατάσταση μετάλλαξης εξονίου 12 του JAK2 με BDS			
Θετικοί	3 (5,4%)	0	3 (1,4%)
Αρνητικοί	53 (94,6%)	160 (100,0%)	213 (98,6%)
Κατάσταση <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit			
Θετικοί	48 (85,7%)	6 (3,8%)	54 (25%)
Αρνητικοί	8 (14,3%)	154 (96,3%)	162 (75%)

**Αριθ.:** Αριθμός ασθενών που διαγιγνώσκονται από τον ερευνητή (αξιολογήσιμος πληθυσμός).

Σε κάθε κατάσταση μετάλλαξης ο αριθμός των ασθενών εκφράζεται ως απόλυτος αριθμός και ως ποσοστό του αξιολογήσιμου πληθυσμού (σε παρένθεση).

**Πίνακας 20. Τελική διάγνωση PV βάσει της γνωμάτευσης του ερευνητή κατόπιν πληροφόρησης από την αμφίδρομη εξέταση και τα κριτήρια του 2008 του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit**

Τελική διάγνωση του ερευνητή με βάση τα κριτήρια του ΠΟΥ σε συνδυασμό με αξιολόγηση JAK2 με BDS

Τελική διάγνωση με βάση τα κριτήρια του ΠΟΥ σε συνδυασμό με αξιολόγηση JAK2 με το <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	PV (Αριθ.=56)	Μη PV (Αριθ.=160)	Σύνολο (Αριθ.=216)
PV	53 (94,6%)	1 (0,6%)	54 (25%)
Μη PV	1 (1,8%)	153 (95,6%)	154 (71,3%)
Απροσδιόριστη	2 (3,6%)	6 (3,8%)	8 (3,7%)

**Αριθ.:** Αριθμός ασθενών που διαγιγνώσκονται από τον ερευνητή (αξιολογήσιμος πληθυσμός)  
Οι αριθμοί εκφράζονται ως απόλυτοι αριθμοί και ως ποσοστό του αξιολογήσιμου πληθυσμού (σε παρένθεση).

## Απροσδιόριστες περιπτώσεις

Τρεις συμμετέχοντες χαρακτηρίστηκαν άγριου τύπου για JAK2 V617F (και με την BDS και με το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit) και επιπλέον είχαν χαμηλές συγκεντρώσεις EPO ορού και απροσδιόριστη ιστολογική μυελού των οστών (δύο διαγνώστηκαν με PV από τον ερευνητή και ένας δεν διαγνώστηκε με PV). Πέντε συμμετέχοντες χαρακτηρίστηκαν άγριου τύπου για JAK2 V617F με την BDS και θετικοί με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit και δεν διενεργήθηκε εξέταση βιοψίας μυελού των οστών (κανείς από τους πέντε δεν διαγνώστηκε με PV από τον ερευνητή). Παρά την απουσία ή την απροσδιόριστη ιστολογική εξέταση μυελού των οστών, οι οκτώ περιπτώσεις συμπεριλήφθηκαν στον υπολογισμό της ειδικότητας και της ευαισθησίας (Πίνακας 21) ως ασύμφωνες.

## Ασύμφωνες περιπτώσεις

Σε δύο συμμετέχοντες η διάγνωση του ερευνητή ήταν διαφορετική από τη διάγνωση που προέκυψε με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit στο πλαίσιο των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ. Ένας από τους συμμετέχοντες είχε επίπεδα EPO ορού εντός του φυσιολογικού εύρους (στα 16,5 IU/l) και δεν παρουσίασε μετάλλαξη JAK2 V617F ή εξονίου 12. Ωστόσο, διαγνώστηκε με PV σύμφωνα με τη γνωμάτευση του ερευνητή. Ένας

από τους συμμετέχοντες είχε επίπεδα EPO ορού κάτω από το φυσιολογικό εύρος και μετάλλαξη JAK2 V617F με BDS αλλά δεν διαγνώστηκε με PV σύμφωνα με τη γνωμάτευση του ερευνητή. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, η διάγνωση του ερευνητή θα έπρεπε να έχει ακολουθήσει αυστηρά τα διαγνωστικά κριτήρια του 2008 του ΠΟΥ. Ωστόσο, σε αυτές τις δύο ασύμφωνες περιπτώσεις, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την κλινική κρίση τους για να ερμηνεύσουν τον αλγόριθμο.

Συνολικά, όπως συνοψίζεται στον Πίνακα 21, η ευαισθησία της διάγνωσης PV με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit ήταν 94,64% (53/56 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 85,13%, 98,88%), υποδεικνύοντας ότι ο συγκεκριμένος προσδιορισμός αναμένεται να ανιχνεύει την PV στη μεγάλη πλειοψηφία των συμμετεχόντων με νόσο. Ομοίως, η ειδικότητα της διάγνωσης PV με χρήση του προσδιορισμού ήταν 95,62% (153/160 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 91,19%, 98,22%), υποδεικνύοντας ότι αναμένεται επίσης να αποκλείει την PV στη μεγάλη πλειοψηφία των συμμετεχόντων χωρίς PV.

Επίσης, υπολογίστηκε η θετική διαγνωστική τιμή Positive predictive value (PPV) και η αρνητική διαγνωστική τιμή Negative predictive value (NPV) και η Positive predictive value (PPV) του kit ήταν 88,33% (53/60 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 77,27%, 93,57%) και η Negative predictive value (NPV) ήταν 98,08% (153/156 συμμετέχοντες, 95% ΔΕ: 94,8%, 99,4%).

**Πίνακας 21. Ανάλυση ευαισθησίας, ειδικότητας, PPV και NPV (αξιολογήσιμος πληθυσμός)**

Μεταβλητή	Εκτίμηση (%)	Κατώτατο όριο εμπιστοσύνης 95% (%)	Ανώτατο όριο εμπιστοσύνης 95% (%)
Ευαισθησία	94,64	85,13	98,88
Ειδικότητα	95,62	91,19	98,22
PPV	88,33	77,27	93,57
NPV	98,08	94,8	99,4

Ο λόγος πιθανοτήτων μιας αρνητικής εξέτασης με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, για τη διάγνωση της PV, στο πλαίσιο των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ, ήταν 21,6 (95% ΔΕ, 10,44, 44,71), υποδεικνύοντας ότι το θετικό αποτέλεσμα για JAK2 V617F είναι περισσότερο πιθανό να προκύψει σε συμμετέχοντες με PV αντί σε συμμετέχοντες χωρίς PV.

Ο λόγος πιθανοτήτων μιας θετικής εξέτασης με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, για τη διάγνωση της PV, στο πλαίσιο των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ, ήταν 0,06 (95% ΔΕ, 0,02, 0,18), υποδεικνύοντας ότι το αρνητικό αποτέλεσμα για JAK2 V617F είναι λιγότερο πιθανό να προκύψει σε συμμετέχοντες με PV αντί σε συμμετέχοντες χωρίς PV.

## Συμπέρασμα της κλινικής μελέτης

Από τις αναλύσεις μπορούν να συναχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η ευαισθησία ήταν 94,64% (95% ΔΕ, 85,13%, 98,88%) υποδεικνύοντας ότι το *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit στο πλαίσιο των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ αναμένεται να ανιχνεύει την PV στη μεγάλη πλειοψηφία των συμμετεχόντων με νόσο.
- Η ειδικότητα στη διάγνωση της PV με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit στο πλαίσιο των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ ήταν 95,62% (95% ΔΕ, 91,19%, 98,22%), υποδεικνύοντας ότι αναμένεται επίσης να αποκλείει την PV στη μεγάλη πλειοψηφία των συμμετεχόντων χωρίς PV.
- Η χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit στο πλαίσιο των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ κατέδειξε Positive predictive value (PPV) 88,33% (95% ΔΕ, 77,27%, 93,57%)\* και Negative predictive value (NPV) 98,08% (95% ΔΕ, 94,8%, 99,4%).
- Ο λόγος πιθανοτήτων μιας αρνητικής εξέτασης με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, για τη διάγνωση της PV, στο πλαίσιο των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ, ήταν 21,61 (95% ΔΕ, 10,44, 44,71), υποδεικνύοντας ότι το θετικό αποτέλεσμα για JAK2 V617F είναι περισσότερο πιθανό να προκύψει σε συμμετέχοντες με PV αντί σε συμμετέχοντες χωρίς PV.
- Ο λόγος πιθανοτήτων μιας θετικής εξέτασης με χρήση του *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, για τη διάγνωση της PV, στο πλαίσιο των διαγνωστικών κριτηρίων του ΠΟΥ, ήταν 0,06 (95% ΔΕ, 0,02, 0,18), υποδεικνύοντας ότι το αρνητικό αποτέλεσμα για JAK2 V617F είναι πολύ λιγότερο πιθανό να προκύψει σε συμμετέχοντες με PV αντί σε συμμετέχοντες χωρίς PV.

\* Η Positive predictive value (PPV) εξαρτάται από τον επιπολασμό. Καθώς ο επιπολασμός ήταν χαμηλός στον πληθυσμό της μελέτης και η ευαισθησία και η ειδικότητα δεν εξαρτώνται από τον επιπολασμό, η ευαισθησία και η ειδικότητα είναι πιο σχετικές.

## Σύνοψη ασφάλειας και απόδοσης

Μπορείτε να πραγματοποιήσετε λήψη της ενότητας για τη σύνοψη ασφάλειας και απόδοσης από την ιστοσελίδα του προϊόντος *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Διατίθεται επίσης στον ιστότοπο της ευρωπαϊκής βάσης δεδομένων για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα (EUDAMED).



# Απόρριψη

- Τα απόβλητα των δειγμάτων και των προσδιορισμών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες ασφαλείας.
- Όλες οι χημικές ουσίες και τα βιολογικά υλικά είναι εν δυνάμει επικίνδυνα. Τα δοκίμια και τα δείγματα είναι εν δυνάμει επικίνδυνα και πρέπει να αντιμετωπίζονται ως βιολογικά επικίνδυνα υλικά.
- Τα χρησιμοποιημένα σωληνάρια δειγμάτων, οι πλάκες και τα απόβλητα από την εκχύλιση DNA πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.
- Οι σειρές σωληναρίων που χρησιμοποιούνται σε ένα πρωτόκολλο qPCR πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.

# Βιβλιογραφία

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.

# Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στη διεύθυνση [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) (για τα στοιχεία επικοινωνίας, επισκεφθείτε τη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Για πληροφορίες σχετικά με την αντιμετώπιση προβλημάτων αναφορικά με τα κιτ εκχύλισης QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (αρ. κατ. 61104) και QIASymphony DSP DNA Mini Kit (αρ. κατ. 937236), ανατρέξτε στα αντίστοιχα εγχειρίδια. Για πληροφορίες σχετικά με την αντιμετώπιση προβλημάτων αναφορικά με το Rotor-Gene AssayManager v2.1, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο *Εγχειρίδιο χρήστη Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

## Σχόλια και προτάσεις

---

### Αυτοματοποιημένη εκχύλιση

- |   |  |
|---|--|
| a) Το δείγμα έχει επισημανθεί ως «unclear» (ακαθόριστο)           | Μπορεί να οφείλεται σε παύση στη διάρκεια της εκτέλεσης εκχύλισης. Αν η εκτέλεση εκχύλισης ολοκληρώθηκε, συνεχίστε στο βήμα του λόγου OD και της μέτρησης συγκέντρωσης. Σε αντίθετη περίπτωση, επαναλάβετε την εκτέλεση εκχύλισης. |
| b) Το δείγμα έχει επισημανθεί ως «unprocessed» (μη επεξεργασμένο) | Αφορά σφάλμα του αρχικού όγκου δείγματος. Επιβεβαιώστε τον όγκο αίματος με πιπέτα. Αν ο όγκος είναι πολύ χαμηλός, αυξήστε τον ώστε το δείγμα να είναι 300 μl και επανεκκινήστε την εκτέλεση.                                       |
| c) Το δείγμα έχει επισημανθεί ως «invalid» (μη έγκυρο)            | Πρόεκυψε σφάλμα κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης εκχύλισης. Επαναλάβετε το βήμα εκχύλισης του δείγματος.   |

## Σχόλια και προτάσεις

- d) Σφάλμα θερμοκρασίας του τεμαχίου ψύξης Ένα μήνυμα σφάλματος στο τέλος της εκτέλεσης σχετικά με τη θερμοκρασία σημαίνει ότι τα δείγματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) από το τέλος της εκτέλεσης εκχύλισης. Αν τα δείγματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για <12 ώρες, η ποιότητα του γονιδιωματικού DNA δεν θα έχει αλλοιωθεί και το γονιδιωματικό DNA μπορεί να ποσοτικοποιηθεί. Αν το χρονικό διάστημα είναι >12 ώρες, τα δείγματα γονιδιωματικού DNA ενδέχεται να έχουν υποβαθμιστεί. Σε αυτήν την περίπτωση, επαναλάβετε την εκχύλιση.
- e) Σφάλμα αφαίρεσης της πλάκας έκλουσης Στο τέλος της εκτέλεσης, ενδέχεται να εμφανιστεί ένα μήνυμα σφάλματος αν η πλάκα έκλουσης αφαιρέθηκε χωρίς να επιλεγεί η σχετική λειτουργία στην οθόνη. Μπορείτε να το διορθώσετε κάνοντας κλικ στο σχετικό πλαίσιο.

## Γενικός χειρισμός για την αξιολόγηση της κατάστασης μετάλλαξης του JAK2 με χρήση του *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit*

### Ο συνολικός αριθμός αντιγράφων δεν συμμορφώνεται και το αντίστοιχο δείγμα είναι μη έγκυρο: η ενίσχυση είναι πολύ χαμηλή

- a) Ελέγξτε τον λόγο  $A_{260}/A_{280}$  Αν είναι <1,7, εκτελέστε νέα εκχύλιση DNA.
- b) Ελέγξτε τη συγκέντρωση DNA Το *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* έχει βελτιστοποιηθεί για συγκέντρωση εργασίας 10 ng/μl. Αν η συγκέντρωση DNA δεν αντιστοιχεί σε αυτήν την τιμή συγκέντρωσης, αραιώστε ή εκχυλίστε εκ νέου το DNA από το ολικό αίμα.
- c) Αν συμμορφώνονται και οι δύο παράμετροι, ενδέχεται να είναι εσφαλμένοι οι όγκοι που έχουν διανεμηθεί με πιπέτα Ελέγξτε και βαθμονομήστε ξανά τις πιπέτες πριν να επαναλάβετε το βήμα της qPCR.

## Σχόλια και προτάσεις

### Αστοχία του μάρτυρα της εκτέλεσης σε πρότυπο QS

- |   |   |
|---|---|
| a) Αναστροφή φιαλιδίου                      | Ελέγξτε τη μέθοδο μεταφοράς με την πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.  |
| b) Αναστροφή κατά τη διάρκεια της διανομής  | Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια και επαναλάβετε το πείραμα χρησιμοποιώντας νέα κλάσματα. Όλοι οι χειρισμοί δειγμάτων, συστατικών του κιτ και αναλώσιμων θα πρέπει να γίνονται πάντα σύμφωνα με τις γενικώς αποδεκτές πρακτικές ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση λόγω μεταφοράς. |
| c) Διασταυρούμενη επιμόλυνση                |   |
| d) Μερική υποβάθμιση του προτύπου           | Αποθηκεύετε το περιεχόμενο του κιτ σε θερμοκρασία -30 έως -15 °C και φυλάσσετε τα μείγματα αντίδρασης σε σκοτεινό χώρο.   |
| e) Μερική υποβάθμιση των αντιδραστηρίων PCR | Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη ψύξη και απόψυξη.   |
| f) Μη ειδική ενίσχυση                       |   |

### Απουσία σήματος ή χαμηλό σήμα για ένα πρότυπο

- |  |  |
|--|--|
| a) Πρόβλημα ομοιογένειας                                 | Ελέγξτε τη μέθοδο μεταφοράς με την πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης. |
| b) Χρήση του ίδιου μείγματος αντίδρασης για QS WT και MT | Επαναλάβετε την εκτέλεση της PCR.  |

### Ο μάρτυρας χωρίς μήτρα (NTC) ή το νερό εμφανίζει θετική ενίσχυση

- |   |   |
|---|---|
| a) Διασταυρούμενη επιμόλυνση  | Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια.  |
| b) Επιμόλυνση αντιδραστηρίων  | Όλοι οι χειρισμοί δειγμάτων συστατικών του κιτ και αναλώσιμων θα πρέπει να γίνονται πάντα σύμφωνα με τις γενικώς αποδεκτές πρακτικές ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση λόγω μεταφοράς. |
| c) Αναστροφή σωληναρίων (σωληνάρια που περιέχουν πρότυπο θετικό για <i>JAK2 V617F</i> έχουν τοποθετηθεί στη θέση NTC) | Ελέγξτε τη μέθοδο μεταφοράς με την πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.  |
| d) Υποβάθμιση ανιχνευτή   | Φυλάσσετε τα μείγματα αντίδρασης σε σκοτεινό χώρο.<br>Ελέγξτε για ψευδώς θετικά αποτελέσματα στην καμπύλη φθορισμού.  |

## Σχόλια και προτάσεις

---

### Απουσία σήματος, ακόμα και στους πρότυπους μάρτυρες

Σφάλμα διανομής με πιπέτα ή παράλειψη αντιδραστηρίων

Ελέγξτε τη μέθοδο μεταφοράς με την πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.

Επαναλάβετε την εκτέλεση της PCR.

### Απουσία σήματος ή χαμηλά σήματα στα δείγματα εσωτερικού μάρτυρα ή/και συνολικός αριθμός αντιγράφων (TCN) κάτω από το εύρος εγκυρότητας αλλά με έγκυρους μάρτυρες εκτέλεσης

Ανασταλτικές επιδράσεις του υλικού του δείγματος, προκαλούμενες από ανεπαρκή καθαρισμό

Ελέγχετε πάντα την ποιότητα του DNA μετρώντας τον λόγο  $A_{260}/A_{280}$  και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.

Επαναλάβετε την προετοιμασία DNA.

### Ο μάρτυρας άγριου τύπου (WTC) είναι θετικός αλλά ο μάρτυρας μεταλλαγμένου τύπου (MTC) δεν είναι αρκετά θετικός

Επιμόλυνση λόγω μεταφοράς

Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια.

Επαναλάβετε το πείραμα με νέα κλάσματα όλων των αντιδραστηρίων.

Όλοι οι χειρισμοί δειγμάτων συστατικών του kit και αναλώσιμων θα πρέπει να γίνονται πάντα σύμφωνα με τις γενικώς αποδεκτές πρακτικές ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση λόγω μεταφοράς.

Διασφαλίστε ότι αλλάζετε τα ρύγχη των πιπέτων ανάμεσα στα αντιδραστήρια.

## Σχόλια και προτάσεις

**Ο μάρτυρας άγριου τύπου (WTC) ενισχύθηκε με μείγμα αντίδρασης MT (αντί για μείγμα αντίδρασης WT) και ο μάρτυρας μεταλλαγμένου τύπου (MTC) ενισχύθηκε με μείγμα αντίδρασης WT (αντί για μείγμα αντίδρασης MT)**

- |   |   |
|---|---|
| a) Διασταυρούμενη επιμόλυνση  | Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια.  |
| b) Επιμόλυνση αντιδραστηρίων  | Επαναλάβετε το πείραμα με νέα κλάσματα όλων των αντιδραστηρίων.   |
| c) Αναστροφή σωληναρίων (σωληνάκια που περιέχουν WTC έχουν τοποθετηθεί σε θέση MTC και αντιστρόφως) | Όλοι οι χειρισμοί δειγμάτων συστατικών του kit και αναλώσιμων θα πρέπει να γίνονται πάντα σύμφωνα με τις γενικώς αποδεκτές πρακτικές ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση λόγω μεταφοράς.<br>Ελέγξτε τη μέθοδο μεταφοράς με την πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης. |

### Αντεστραμμένη ανίχνευση του θετικού μάρτυρα

- |   |  |
|---|--|
| a) Διασταυρούμενη επιμόλυνση  | Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια και επαναλάβετε το πείραμα   |
| b) Αναστροφή διανομής του μείγματος αντίδρασης στο σωληνάριο ή το προ-μείγμα. | χρησιμοποιώντας νέα κλάσματα. Όλοι οι χειρισμοί δειγμάτων, συστατικών του kit και αναλώσιμων θα πρέπει να γίνονται πάντα σύμφωνα με τις γενικώς αποδεκτές πρακτικές ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση λόγω μεταφοράς.<br>Ελέγξτε τη μέθοδο μεταφοράς με την πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης. |













### Απουσία σήματος για ένα δείγμα ή έναν μάρτυρα, ακόμα και για τον εσωτερικό μάρτυρα

- |   |   |
|---|---|
| a) Δεν έχει προστεθεί μείγμα αντίδρασης ή κάποιο από τα συστατικά του (π.χ. Taq πολυμεράση) | Ελέγξτε τη μέθοδο μεταφοράς με την πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης. Αν δεν έχει ενισχυθεί ο εσωτερικός μάρτυρας, δεν προστέθηκε μείγμα αντίδρασης ή έχει υποβαθμιστεί. |
| b) Υποβάθμιση μείγματος αντίδρασης  | Επαναλάβετε το βήμα της qPCR με νέο μείγμα αντίδρασης.  |



# Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα εμφανίζονται στις οδηγίες χρήσης ή στη συσκευασία και την επισήμανση:

Σύμβολο	Ορισμός συμβόλου
 <N>	Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις
	Ημερομηνία λήξης
	Το προϊόν πληροί τις απαιτήσεις του Ευρωπαϊκού Κανονισμού 2017/746 για τα in vitro διαγνωστικά ιατροτεχνολογικά προϊόντα.
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός παρτίδας
	Αριθμός υλικού (δηλ. επισήμανση στοιχείου)
	Διεθνής κωδικός μονάδων εμπορίας
	Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	Περιεχόμενα
	Συστατικό
	Αριθμός

## Σύμβολο

## Ορισμός συμβόλου

Rn

Η ένδειξη R αφορά την αναθεώρηση των οδηγιών χρήσης και η είναι ο αριθμός αναθεώρησης



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης πραγματοποιώντας λήψη από τη διεύθυνση [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623)



Φυλάσσεται προστατευμένο από το φως



Προσοχή, συμβουλευτείτε τα συνοδευτικά έγγραφα

# Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Για 24 αντιδράσεις: Μάρτυρας γονιδίου JAK2 άγριου τύπου, Γονίδιο ελέγχου JAK2 V617F, Πρότυπα ποσοτικοποίησης JAK2 WT, Πρότυπα ποσοτικοποίησης JAK2 MT, Μείγμα αντίδρασης JAK2 WT, Μείγμα αντίδρασης JAK2 MT, Ταq DNA πολυμεράση, Ρυθμιστικό διάλυμα TE για αραίωση, νερό για NTC	674623
<b>Σχετικά προϊόντα</b>		
<b>Rotor-Gene Q MDx – για επικυρωμένη για IVD ανάλυση real-time PCR σε κλινικές εφαρμογές</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπροντό) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπροντό) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Λογισμικό για εξετάσεις ρουτίνας σε συνδυασμό με τα όργανα Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Λογισμικό μίας άδειας χρήσης για εγκατάσταση σε έναν υπολογιστή	9025620
Loading Block 72 x 0,1ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία της αντίδρασης με πιπέτα μονού αυλού σε 72 σωληνάρια του 0,1 ml	9018901

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Strip Tubes and Caps, 0,1ml (250)	250 σειρές των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 1.000 αντιδράσεις	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1ml (2500)	10 × 250 ταινίες των 4 σωληναρίων και πώματα για 10.000 αντιδράσεις	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Για 50 παρασκευές: Στήλες QIAamp Mini Spin Columns, ρυθμιστικά διαλύματα, αντιδραστήρια, σωληνάκια, VacConnectors	61104
QIASymphony DSP DNA Mini Kit	Για 192 παρασκευές 200 μl έκαστη: Περιέχει 2 φύσιγγες αντιδραστηρίων, θήκες ενζύμων και παρελκόμενα.	937236
<b>QIASymphony SP and accessories</b>		
QIASymphony SP System	Μονάδα παρασκευής δειγμάτων QIASymphony, περιλαμβάνει εγκατάσταση και κατάρτιση και εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία	9001751
QIASymphony SP	Μονάδα παρασκευής δειγμάτων QIASymphony: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Φύσιγγες παρασκευής δειγμάτων 8 βυθισμάτων για χρήση με το QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers για χρήση με το QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 μl, Qsym SP (1024)	Disposable Filter-Tips, τοποθετημένα σε θήκη (8 x 128). Για χρήση με τα όργανα QIAcube® και QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 μl, Qsym SP (1024)	Disposable Filter-Tips, τοποθετημένα σε θήκη (8 x 128). Για χρήση με τα όργανα QIASymphony SP/AS	997024

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Μη αποστειρωμένα σωληνάρια πολυπροπυλενίου (μέγιστης χωρητικότητας 0,85 ml, χωρητικότητας μικρότερης από 0,7 ml, χωρητικότητας έκλουσης 0,4 ml), 2.304 σε θήκες των 96, με σειρές πωμάτων	19588
RNase A (17.500 U)	2,5 ml (100 mg/ml, 7.000 μονάδες/ml, διάλυμα)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml Tissue Lysis Buffer για 1.000 παρασκευές	19076

Για ενημερωμένες πληροφορίες σχετικά με τις άδειες χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, βλ. τις οδηγίες χρήσης του αντίστοιχου kit της QIAGEN. Οι οδηγίες χρήσης των kit της QIAGEN διατίθενται στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό αντιπρόσωπο.

# Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

Αναθεώρηση	Περιγραφή
R1, Ιούλιος 2022	Αρχική κυκλοφορία

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή.

### Συμφωνία περιορισμένης άδειας χρήσης για το *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 RGQ PCR Kit

Η χρήση του προϊόντος αυτού συνεπάγεται την αποδοχή εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος των παρακάτω όρων:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης με τα συστατικά που περιλαμβάνονται στο σετ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του σετ σε οποιαδήποτε στοιχεία που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το σετ, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, σε αυτές τις οδηγίες χρήσης και τα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Ορισμένα από αυτά τα επιπλέον πρωτόκολλα έχουν παρασχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται για αυτά και δεν παρέχει καμία εγγύηση ότι δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το σετ ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το σετ και τα συστατικά του παραχωρούνται με άδεια για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η επανепεξεργασία, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλη άδεια, ρητή ή σιωπηρή, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του σετ συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν τυχόν ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιώνεται για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής της ιδιοκτησίας σχετικά με το σετ ή/και τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Εμπορικά σήματα: QIAGEN<sup>®</sup>, *ipsogen*<sup>®</sup> QIAamp<sup>®</sup>, QIAcube<sup>®</sup>, QIASymphony<sup>®</sup>, HotStarTaq<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup>, Rotor-Gene AssayManager<sup>®</sup> (QIAGEN Group), SYBR<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc.), Sarstedt<sup>®</sup> (Sarstedt AG & Co). Οι κατατεθείσες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευόμενα από τον νόμο, ακόμα και αν αυτό δεν υποδεικνύεται ρητώς.

07/2022 HB-2872-001 1123592 © 2022 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.



Παραγγελίες [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Τεχνική υποστήριξη [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com)  
Ιστότοπος [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)