

ipsogen[®] JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan käyttöohje



Versio 2



In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM -laitteen kanssa



0197



674623



QIAGEN, GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSA



1123592FI

Sisältö

Käyttötarkoitus.....	6
Käyttötarkoituksen mukainen käyttäjä.....	6
Kuvaus ja toimintaperiaate	7
Yhteenveto ja selitykset	7
Menetelmän toimintaperiaate.....	11
Toimitetut materiaalit.....	15
Sarjan sisältö.....	15
Sarjan sisältö (jatkuu).....	15
Sarjan komponentit	17
Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	19
Tarvikkeet ja reagenssit manuaaliseen DNA:n eristämiseen	19
Tarvikkeet ja reagenssit automaattiseen DNA:n eristämiseen	19
PCR-tarvikkeet ja -reagenssit.....	19
Laitteet.....	20
Laitte näytteen valmisteluun	20
Real-time PCR -välineet.....	20
Varoitukset ja varotoimet	21
Turvallisuustiedot	21
Tiedot hätätilanteeseen	21
Varotoimet.....	22
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	24
Kuljetusolosuhteet	24

Säilytysolosuhteet	24
Käytöstabiilius	24
Näytteiden säilytys ja käsittely.....	26
Kokoverinäytteet.....	26
Genomiset DNA-näytteet	26
Protokolla: genomisen DNA:n eristäminen ja valmistelu kokoverestä	27
Manuaalinen genomisen DNA:n eristys QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjalla	27
Automaattinen genomisen DNA:n uutto QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjalla	31
DNA:n kvalifointi ja kvantifointi	36
Genomisten DNA-näytteiden normalisointi	36
Protokolla: qPCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla	37
Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ydinohjelmiston asennus	38
Gamma Plug-in -lisäosan asentaminen ja määrittäprofiilin tuominen	39
Näytteiden käsittely Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteessa, jossa on 72 putken roottori	42
qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteessa, jossa on 72 putken roottori.....	45
Tulosten tulkinta	58
Rajoitukset	65
Suorituskykyominaisuudet	67
Analyttinen suorituskyky	67
WHO:n kansainvälisen genomisen JAK2 V617F -viitepaneelin testaaminen (NIBSC, paneelin koodi 16/120).....	76
Kliininen suorituskyky.....	83
Turvallisuuden ja suorituskyvyn yhteenveto.....	90

Hävittäminen.....	91
Lähdeviitteet.....	92
Vianmääritys.....	94
Symbolit.....	98
Tilastiedot.....	100
Asiakirjan muutoshistoria.....	103

Käyttötarkoitus

ipsogen[®] JAK2 RGQ PCR Kit on kvantitatiivinen in vitro -PCR-määritys, joka on tarkoitettu JAK2 V617F/G1849T -mutaation havaitsemiseen ja kvantifiointiin ihmisen perifeerisestä kokoverestä, jonka hyytymisenestoon on käytetty 2K-EDTA-ainetta, eristetystä genomisesta DNA:sta. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla saadut tulokset on tarkoitettu käytettäväksi epäillyn, Philadelphia (Ph) -kromosomin osalta negatiivisen myeloproliferatiivisen neoplasman (MPN) arvioinnin apuna ja molekulaaristen sairauksien seurannassa MPN-potilailla. Saatu diagnostinen tulos on tulkittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai patologisten löydösten kanssa.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit on tarkoitettu käytettäväksi vain yhdessä QIAGEN Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM -laitteen ja muiden hyväksytyjen työnkulun osien kanssa käyttöohjeen mukaisesti. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit ei ole automaattinen laite, vaikka sillä tehtävän analyysin apuna käytetään erillistä ohjelmistoa.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit on tarkoitettu in vitro -diagnostiseen käyttöön.

Käyttötarkoituksen mukainen käyttäjä

Tämä sarja on tarkoitettu ammattikäyttöön.

Tuotetta saavat käyttää vain asianmukaisesti opastetut, molekyylibiologian tekniikoihin koulutetut ja tämän nimenomaisen tekniikan tuntevat ammattihenkilöt. Laitteen toimenpide on tehtävä molekyylibiologisessa laboratorioympäristössä.

Kuvaus ja toimintaperiaate

Yhteenveto ja selitykset

Janus-tyrosiinkininaasi 2 -geeniin (*JAK2*) vaikuttava toistuva somaattinen mutaatio, *V617F*, löydettiin vuonna 2005 (1–4), mikä johti merkittävään läpimurtoon myeloproliferatiivisen neoplasman ymmärtämisessä, luokittelussa ja diagnosoinnissa. *JAK2* on useiden sytokiinien (erytropoietiini mukaan lukien) tärkeä solusisäinen signaalimolekyyli.

JAK2 V617F -mutaatio löytyy yli 95 prosentilta polysytemia veraa (Polycythemia Vera, PV) sairastavilta, noin 60 prosentilta essentiaalista trombosytemiaa (Essential Thrombocythemia, ET) ja idiopaattista myelofibroosia (Primary Myelofibrosis, PMF) sairastavilta potilailta (5). (*JAK2 V617F* on löytynyt myös joissakin harvoissa tapauksissa potilailta, joilla on myelomonosyyttinen leukemia, myelodysplastinen oireyhtymä (myelodysplastic syndrome, MDS), systeeminen mastosytoosi tai krooninen neutrofiilileukemia, mutta 0 %:ssa tapauksista kroonista myelooista leukemiaa (Chronic Myeloid Leukemia, CML) sairastavalta potilaalta (6).

JAK2 V617F -mutaatio jatkaa yhtä muutosta *JAK2*-nukleotidissa 1849 eksonissa 14. Tuloksena on valiinin (Valine, V) korvautuminen fenyylialaniinilla (Phenylalanine, F) proteiinin paikassa 617 (JH2-domeeni). *JAK2*-geeni koodaa tyrosiinkininaasia, joka liittyy viestimiseen sytokiinireseptorille STAT-reitin kautta. Kun geeni on jatkuvasti aktiivinen, useimmiten *JAK2 V617F* -mutaation kautta, se aiheuttaa muutoksia erytroidisissa progenitorisoluissa, herkistymistä erytropoietiinille ja myöhempien signaalireittien aktivoitumista. Lisäksi oletetaan, että häiriöt *JAK2*:n toiminnassa edistävät onkogeenista ilmenemistä, mitoottista uudelleenyhdistymistä ja geneettistä epätasapainoa (7).

Myeloproliferatiivisten neoplasmojen diagnosointi on perinteisesti perustunut kliinisiin, luuydinhistologisiin ja sytogeneettisiin kriteereihin. Sairaudelle spesifin molekyyli-merkkiaineen löytyminen yksinkertaisti diagnoosiprosessia ja paransi sen tarkkuutta. *JAK2 V617F*-mutaation löytyminen kuuluu Maailman terveysjärjestön (World Health Organization, WHO) laatimiin BCR-ABL-negatiivisten myeloproliferatiivisten neoplasmojen diagnoosikriteereihin 2016 (8) (taulukko 1), ja tämä mutaatio on tärkeä kriteeri diagnoosin varmistamiselle.

Taulukko 1. WHO:n kriteerit myeloproliferatiivisten neoplasmojen diagnosoille

PV:n diagnostiset kriteerit

- | | |
|--------------|---|
| Pääkriteerit | <ol style="list-style-type: none">1. Hemoglobiini (Hgb) > 16,5 g/dl (miehet) tai > 16,0 g/dl (naiset) tai hematokriitti > 49 % (miehet) tai > 48 % (naiset) tai kasvanut punasolulmassa > 25 % yli keskimääräisen normaalin odotetun arvon2. Luuydinbiopsia, (bone marrow, BM) jossa näkyy ikään nähden hypersellulaarisuutta ja kolmen solulinjan kasvua (panmyeloosi), mukaan lukien merkittävää erytroidista, granulosityttistä ja megakaryosyyttistä proliferaatiota ja pleomorfinia kypsiä megakaryosyyttejä (ko'oisia eroja)3. JAK2V617F:n tai JAK2:n 12-eksonin mutaatio |
|--------------|---|

Sivukriteerit Pienentynyt seerumin erytropoietiiniipitoisuus

PV:n diagnosointi edellyttää kaikkien kolmen pääkriteerin täyttymistä tai kahden ensimmäisen pääkriteerin ja yhden sivukriteerin täyttymistä†.

† Kriteeriä numero 2 (luuydinbiopsia) ei välttämättä edellytetä tapauksissa, joissa on pysyvä absoluuttinen erytrocytoosi mitattuna hemoglobiinitasoina > 18,5 g/dl miehillä (hematokriitti 55,5 %) tai > 16,5 g/dl naisilla (hematokriitti 49,5 %), jos pääkriteeri numero 3 ja sivukriteeri esiintyvät. Alkuvaiheessa oleva myelofibroosi (esiintyy enintään 20 %:lla potilaista) voidaan kuitenkin havaita vain luuydinbiopsian avulla. Biopsian löydökset voivat ennustaa nopeampaa etenemistä avoimeen myelofibroosiin (post-PV MF).

ET:n diagnostiset kriteerit

- | | |
|--------------|---|
| Pääkriteerit | <ol style="list-style-type: none">1. Verihiutaleiden määrä $\geq 450 \times 10^9/l$2. Luuydinbiopsia, jossa näkyy pääasiassa megakaryosyyttien linjojen proliferaatiota, joka koostuu kasvaneesta määrästä suurentuneita, kypsiä megakaryosyyttejä, joiden tuma on hyperlohkoinen. Ei merkittävää lisäystä tai vasemmalle siirtymistä neutrofiilien granulopoiesissa tai erytropoiesissa ja erittäin harvoin lievää (tason 1) lisääntymistä retikuliinisäikeissä3. Ei täyty WHO:n kriteereitä seuraaville: <i>BCR-ABL1</i>+ CML, PV, PMF, myelodysplastiset oireyhtymät tai muut myeloidiset neoplasmat4. JAK2, CALR- tai MPL-mutaatio |
|--------------|---|

Sivukriteerit Klonaalisen merkkiaineen läsnäolo tai ei näyttöä reaktiivisesta trombocytoosista

ET:n diagnosointi edellyttää kaikkien neljän pääkriteerin täyttymistä tai kolmen ensimmäisen pääkriteerin ja yhden sivukriteerin täyttymistä.

prePMF:n diagnostiset kriteerit

- Pääkriteerit
1. Megakaryosyyttinen proliferaatio ja atypia, johon ei liity > tason 1 retikuliinifibroosia ja johon liittyy iän suhteen säädetty luytimen lisääntynyt solukkuus, granulosityttinen proliferaatio ja usein myös vähentynyt erytrosytoipoiesi
 2. Ei täyty WHO:n kriteereitä seuraaville: *BCR-ABL1*⁺ CML, PV, ET, myelodysplastiset oireyhtymät tai muut myeloidiset neoplasmat
 3. *JAK2*, *CALR*- tai *MPL*-mutaatio, tai mikäli näitä mutaatioita ei ole, jonkin toisen klonaalisen merkkiaineen läsnäolo[†] tai vähäisen reaktiivisen luytimen retikuliinifibroosin poissaolo[‡]

Sivukriteerit Ainakin yksi seuraavista, vahvistettu kahdella peräkkäisellä määrityksellä:

- a.) Anemia, joka ei liity mihinkään komorbidiin tilaan
- b.) Leukosytoosi $\geq 11 \times 10^9/l$
- c.) Palpoituvaa suurentunutta pernaa
- d.) Laktatidehydrogenaasi (LDH) kasvanut yli laitoksessa käytettävän viitealueen normaalin ylärajan

prePMF-diagnosi edellyttää kaikkien kolmen pääkriteerin ja vähintään yhden sivukriteerin täyttymistä.

† Jos jokin kolmesta pääasiallisesta klonalisesta mutaatiosta puuttuu, sairauden klonaalisen luonteen määrittämisessä auttaa usein niiden yhteydessä esiintyvien mutaatioiden (esim. *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) määrittäminen.

‡ Vähäinen (tason 1) infektion kannalta toissijainen retikuliinifibroosi, autoimmuunihäiriö tai muut krooniset tulehdukselliset tilat, karvasoluleukemia tai muut lymfoidiset neoplasmat, metastaatinen maligneetti tai toksiset (krooniset) myelopatiat.

Avoimen PMF:n diagnostiset kriteerit

Pääkriteerit	<ol style="list-style-type: none">1. Megakaryosyytin proliferaatiota ja atypiaa sekä joko retikuliini- ja/tai kollageenifibroosia tasoilla 2 tai 32. Ei täytyä WHO:n kriteereitä seuraaville: ET, PV, <i>BCR-ABL1</i>⁺ CML, myelodysplastiset oireyhtymät tai muut myeloidiset neoplasmat3. JAK2-, CALR- tai MPL-mutaatio, tai mikäli näitä mutaatioita ei ole, jonkin toisen klonalisen merkkiaineen läsnäolo[†] tai reaktiivisen myelofibroosin poissaolo[‡]
--------------	--

Sivukriteerit	Ainakin yksi seuraavista, vahvistettu kahdella peräkkäisellä määrityksellä: <ol style="list-style-type: none">a.) Anemia, joka ei liity mihinkään komorbidiin tilaanb.) Leukosytoosi $\geq 11 \times 10^9/l$c.) Palpoituvaa suurentunut pernad.) Laktaattidehydrogenaasi (LDH) kasvanut yli laitoksessa käytettävän viitealueen normaalin ylärajane.) Leukoerythroblastosi
---------------	---

Avoimen PMF:n diagnoosi edellyttää kaikkien kolmen pääkriteerin ja vähintään yhden sivukriteerin täyttymistä.

† Jos jokin kolmesta pääasiallisesta klonalisesta mutaatiosta puuttuu, sairauden klonalisen luonteen määrittämisessä auttaa usein niiden yhteydessä esiintyvien mutaatioiden (esim. *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) määrittäminen.

‡ Infektion kannalta toissijainen luuytimen fibroosi, autoimmuunihäiriö tai muut krooniset tulehdukselliset tilat, karvasoluleukemia tai muut lymfoidiset neoplasmat, metastattinen maligneetti tai toksiset (krooniset) myelopatiat.

Huomautus: CML: krooninen myeloinen leukemia; ET: essentiaalinen trombosytopenia; PMF: primaari myelofibroosi; PV: polysystemia vera; WHO: World Health Organization

Lisäksi *JAK2 V617F* -mutaation löytyminen MPN-potilailta on tuonut esiin myös uuden kohteen hoidoille. Molekulaaristen sairauksien seuranta mittaamalla *JAK2 V617F* -mutaation taakkaa on osoittautunut käytännölliseksi tavaksi arvioida hoitovastetta ja ennustaa relapseja potilailla, joille on tehty allogeeninen kantasolusiirre (9). Molekulaarisen vasteen konseptit on määritetty selkeästi uusimmissa European LeukemiaNet (ELN)- ja International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) -suosituksissa (10, 11) ja niihin on viitattu myös National Comprehensive Cancer Networkin (NCCN) (12) ja European Society of Medical Oncology (ESMO) ohjeistuksissa (5). Täysivaltaisena molekulaarisena vasteena pidetään jo olemassa olevan molekulaarisen poikkeavuuden tuhoamista ja osittaisena molekulaarisena vasteena pidetään *JAK2 V617F* -mutanttialleelitaakan $\geq 50\%$:n vähentymistä (osittainen vaste

sovellettavissa vain potilaisiin, joiden *JAK2 V617F* -mutanttialleelitaakka oli vähintään 20 % lähtötilanteesta) (10, 11).

Vuodesta 2006 *JAK2 V617F*:n havaitsemiseen ja mahdolliseen kvantifiointiin on ollut saatavilla useita laboratorioissa kehitettyjä testimenetelmiä, jotka periaatteessa perustuvat PCR-tekniikoihin tai sekvensointiin. Näillä testeillä on erilainen analyttinen suorituskyky, erityisesti tarkkuuden ja herkkyydeltään osalta. Tämä ero voi vaikuttaa luuydinanalyysin tarpeeseen, lopullisen diagnoosin määrittämiseen kuluvaan aikaan, mahdollisesti diagnoosin tekemiseen sekä molekulaarisen sairauden seurannan tehoon.

Koska *JAK2 V617F*-mutanttialleelilla on useita mahdollisia myeloproliferatiivisten neoplasmojen yhteydessä esiintyviä alleeliosia (esiintyminen jopa vain 1 %:n tasolla), laboratorioita rohkaistaan tarjoamaan *JAK2 V617F* -mutaatiotestejä, joiden analyttinen herkkyys on suuri. Soveltuviin tekniikoihin pitäisi kuulua matala havaitsemisraja (vähintään 1 % diagnoointiin ja vähintään 0,1 % molekulaarisen sairauden seurantaan) sekä korkea uusittavuus (5, 13).

Menetelmän toimintaperiaate

Useita erilaisia tekniikoita on ehdotettu yksittäisen nukleotidin polymorfismin (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) osuuden määrittämiseen kvantitatiivisesti DNA-näytteistä. Jotkin, kuten sulamiskäyrät ja sekvensointi, ovat vain puolikvantitatiivisia. Reaaliaikaiseen kvantitatiiviseen polymeerasiketjureaktioon (qPCR) perustuvia menetelmiä suositetaan niiden suuren herkkyyden vuoksi. SNP-spesifisen alukkeiden käyttö mahdollistaa mutatoituneen (Mutant, MT) tai villityypin (Wild-type, WT) alleelin selektiivisen monistuksen niin, että se on helposti havaittavissa reaaliaikaisella qPCR-laitteella. Tämä mahdollistaa < 0,1 %:n herkkyyden, joka on linjassa tällä hetkellä hyväksytyyn, diagnostiikassa kliiniseen positiivisuuteen käytetyn *JAK2*-rajan 1 % kanssa sekä molekulaarisen sairauden seurantaan suositellun $\leq 0,1$ %:n *JAK2 V617F* -alleelitaakan havaitsemisrajan kanssa (5, 13). On kuitenkin huomattava, että jotkut kliiniset asiantuntijat katsovat kaiken *JAK2 V617F* -kuorman esiintymisen kliinisesti merkittäväksi diagnoosintihetkellä, ja siksi tarvitaan herkkä menetelmä, kuten qPCR (14). *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* perustuu tähän tekniikkaan.

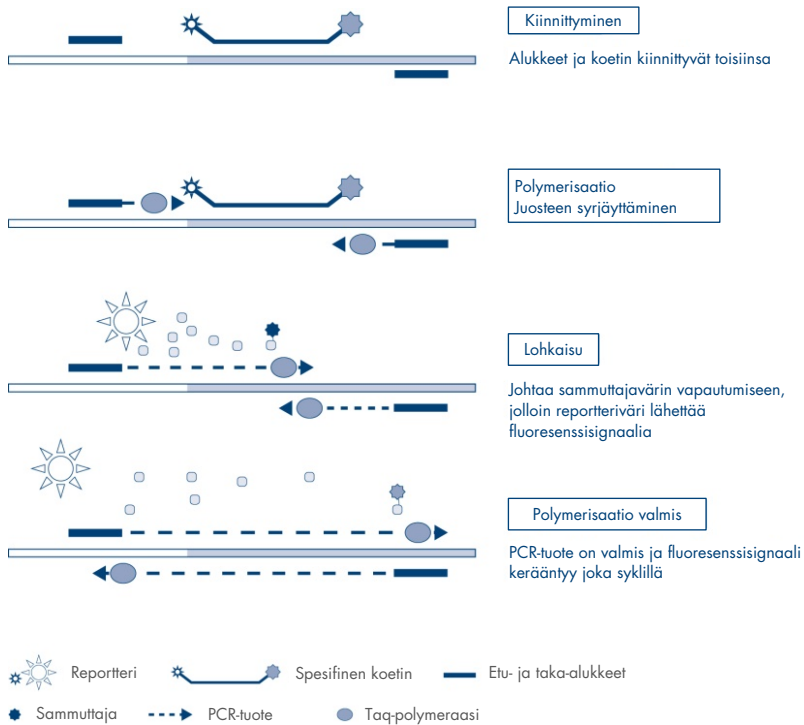
qPCR:n käyttäminen mahdollistaa PCR-tuotteiden tarkan monistuksen PCR-monistumisprosessin eksponentiaalisessa vaiheessa. Kvantitatiiviset PCR-tiedot saadaan nopeasti ilman PCR:n jälkeistä käsittelyä tunnistamalla fluoresenssisignaali reaaliaikaisesti PCR-syklin aikana ja/tai jälkeen, mikä vähentää merkittävästi PCR-tuotekontaminaation vaaraa. Tällä hetkellä qPCR-tekniikoissa on kolme päätyyppiä: qPCR-analyysi SYBR® Green I Dye -väriä käyttämällä, qPCR-analyysi hydrolyysikoettimia käyttämällä ja qPCR-analyysi hybridisaatiokoettimia käyttämällä.

QIAGENin määrittäminen hyödyntää qPCR-oligonukleotidien hydrolyysiä. PCR:n aikana etu- ja taka- alukkeet hybridisoituvat tiettyyn sekvenssiin. Samassa seoksessa on toinen väriaineeseen linkitetty aluke. Tämä koetin, joka koostuu 5'-reportterivärillä merkitystä oligonukleotidista ja värjäämättömästä 3'-sammuttajasta, hybridisoituu kohdesekvenssiin PCR-tuotteessa. qPCR-analyysi hydrolyysikoettimilla hyödyntää *Thermus aquaticus* (Taq) -DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleasiaktiivisuutta. Koettimen ollessa ehjä reportterivärin läheisyys sammuttajaan tukahduttaa reportterin fluoresenssin pääasiassa Förster-tyyppisellä energiansiirrolla.

Jos kohdesekvenssi on PCR-ajossa läsnä, sekä etu- että taka-alukkeet kiinnittyvät koettimen molemmiin puoliin. DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleasiaktiivisuus leikkaa koettimen reportterin ja sammuttajan välistä vain, jos kolme oligonukleotidia hybridisoituu kohteeseen. Sen jälkeen koettimen palaset irtoavat kohteesta ja juosteen polymerisaatio jatkuu. Koettimen 3'-pää on estetty, jotta koetin ei pitene PCR:n aikana (kuva 1). Tämä prosessi tapahtuu jokaisessa syklistä eikä se häiritse tuotteen eksponentiaalista kertymistä.

Fluoresenssisignaalin voimistuminen havaitaan vain, jos kohdesekvenssi on komplementaarinen alukkeisiin ja koettimeen nähden ja täten monistuu PCR-ajon aikana. Näiden vaatimusten vuoksi epäspesifistä monistusta ei havaita. Siksi fluoresenssin lisääntyminen on suoraan suhteessa kohteen monistumiseen PCR:n aikana.

qPCR-tekniikkaa käytettäessä kynnysarvon ylittävän signaalin tunnistamiseen tarvittavien PCR-sykliden määrä eli vaihduntapiste (Crossing point, Cp) tai sykliden kynnysarvo (Cycle Threshold, CT) on suoraan verrannollinen reaktion alussa olevan kohteen määrään.



Kuva 1. Reaktioperiaate. Tässä määritystarvikesarjassa käytetty kvantitatiivinen alleelispesifinen PCR-tekniikka mahdollistaa herkän, tarkan ja hyvin uusittavan SNP:iden havaitsemisen. Tämä tekniikka perustuu spesifisten taka-alukkeiden käyttöön villityypin ja V617F-alleeleista, tässä järjestyksessä (15). Vain täydellinen vastaavuus alukseen ja kohde-DNA:n välillä mahdollistaa pitenemisen ja monistamisen PCR-reaktiossa (kuva 2).

WT-reaktioseos



MT-reaktioseos



Kuva 2. Alleelispesifinen PCR. Villityypin tai V617F-alueiden ja koetinseoksen käyttö mahdollistaa villityypin tai mutatoituneen alleelin spesifisen tunnistuksen kahdessa erillisessä reaktiossa, jotka toteutetaan samalla näytteellä. Tulokset voidaan ilmaista mutanttikopioiden prosenttimääränä JAK2-kopioiden kokonaismäärästä. **MT:** mutantti; **WT:** villityyppi.

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit

24

Tuotenumero

674623

Väri	Nimi	Putken tunnus	Määrä
Punainen	JAK2 Mutant Control (JAK2-mutanttikontrolli) (100 % V617F-alleeli)	MT Ctrl	33 µl
Vihreä	JAK2 WT Control (JAK2-villityypin kontrolli) (100 % villityypin alleeli)	WT Ctrl	33 µl
Punainen	JAK2 MT Quant Standard 1 (JAK2-mutaation kvantifiointistandardi 1) (5 x 10 ¹ V617F kopiota / 5 µl)	MT QS1	20 µl
Punainen	JAK2 MT Quant Standard 2 (JAK2-mutaation kvantifiointistandardi 2) (5 x 10 ² V617F kopiota / 5 µl)	MT QS2	20 µl
Punainen	JAK2 MT Quant Standard 3 (JAK2-mutaation kvantifiointistandardi 3) (5 x 10 ³ V617F kopiota / 5 µl)	MT QS3	20 µl
Punainen	JAK2 MT Quant Standard 4 (JAK2-mutaation kvantifiointistandardi 4) (5 x 10 ⁴ V617F kopiota / 5 µl)	MT QS4	20 µl
Vihreä	JAK2 WT Quant Standard 1 (JAK2-villityypin kvantifiointistandardi 1) (5 x 10 ¹ villityypikopiota / 5 µl)	WT QS1	20 µl
Vihreä	JAK2 WT Quant Standard 2 (JAK2-villityypin kvantifiointistandardi 2) (5 x 10 ² villityypikopiota / 5 µl)	WT QS2	20 µl
Vihreä	JAK2 WT Quant Standard 3 (JAK2-villityypin kvantifiointistandardi 3) (5 x 10 ³ villityypikopiota / 5 µl)	WT QS3	20 µl

Sarjan sisältö (jatkuu)

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

Väri	Nimi	Putken tunnus	Määrä
Vihreä	JAK2 WT Quant Standard 4 (JAK2-villityypin kvantifiointistandardi 4) (5 x 10 ⁴ villityyppikopiota / 5 µl)	WT QS4	20 µl
Punainen	JAK2 MT Reaction Mix (JAK2-mutantireaktioseos)	MT Mix	1010 µl
Vihreä	JAK2 WT Reaction Mix (JAK2-villityypin reaktioseos)	WT Mix	1010 µl
Mintunvihreä	Taq DNA polymerase (Taq DNA -polymeraasi) (HotStarTaq® 5 yksikköä/µl)	Taq	85 µl
Valkoinen	TE buffer for sample dilution (TE-puskuri näytteen laimennukseen)	TE	1,9 ml
Valkoinen	Water for no template control (Vettä mallittomaan kontrolliin) (NTC)	NTC	1,9 ml
ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -käsikirja (suomi)			1

Sarjan komponentit

Sarjan tärkeimmät osat on esitelty alla.

Taulukko 2. Toimitetut reagenssit

Reagenssi	Vaikuttavat ainesosat	Määrä
JAK2 Mutant Control (JAK2-mutaation kontrolli)	Solulinjan DNA:ta, jossa 100-prosenttinen V617F-alleeli	33 µl
JAK2 WT Control (JAK2 -villityypin kontrolli)	Solulinjan DNA:ta, jossa 100-prosenttinen villityypin alleeli	33 µl
JAK2 WT Quant Standards (JAK2-mutaation kvantifiointistandardit) (QS1–QS4)	Plasmidi, jossa on V617F-alleelisekvensi	Kukin 20 µl
JAK2 WT Quant Standards (JAK2-villityypin kvantifiointistandardit) (QS1–QS4)	Plasmidi, jossa on villityypin alleelisekvensi	Kukin 20 µl
JAK2 MT Reaction Mix (JAK2-mutantireaktioseos)	Oligonukleotidit mutatoituneen alleelin havaitsemiseen ja sisäiseen kontrolliin, PCR-puskuri, MgCl ₂ , dNTPs	1010 µl
JAK2 WT Reaction Mix (JAK2-villityypin reaktioseos)	Oligonukleotidit villityypin alleelin havaitsemiseen ja sisäiseen kontrolliin, PCR-puskuri, MgCl ₂ , dNTPs	1010 µl
Taq DNA polymerase (Taq DNA -polymeraasi)	Hot-start Taq DNA -polymeraasi varastopuskurissa	85 µl
TE buffer for sample dilution (TE-puskuri näytteen laimennukseen)	Tris-EDTA-puskuriliuos	1,9 ml
Water for no template control (Vettä mallittomaan kontrolliin) (NTC)	Nukleasiton vesi	1,9 ml

Reagenssit

Tämän sarjan kanssa toimitettuja reagensseja, lueteltu yllä taulukossa 2 tarvitaan testinäytteiden laimentamiseen tarvittavaan syöttöpitoisuuteen ja qPCR-reaktioiden suorittamiseen JAK2-mutantti- ja villityypialleelien havaitsemista ja kvantifiointia varten mutaatioprosentin määrittämisessä. Reaktioseoksiin kuuluvaa sisäistä monistamiskontrollia käytetään qPCR:n estymisen valvomiseen ja sulkemaan pois PCR-reaktion epäonnistumisen mahdollisuuden, jos tulokset ovat negatiivisia.

Kontrollit ja standardit

Sarjaan kuuluu kaksi kontrollia: JAK2-mutaation kontrolli, jota käytetään JAK2-mutaation (mutant, MT) reaktioseoksen positiivisena kontrollina, ja JAK2-villityypin (wild-type, WT) kontrolli, jota käytetään JAK2-villityypin (WT) reaktioseoksen positiivisena kontrollina. Nukleasiton vesi toimitetaan kummankin reaktioseoksen mallitonta kontrollia varten.

Sarjaan kuuluu neljä JAK2-mutanttin (MT) ja neljä JAK2-villityypin (WT) kvantitointistandardia (Quantitation Standard, QS). Niitä käytetään JAK2 MT- ja -WT-kopioiden määrän laskemiseen sekä myöhemmin testinäytteiden *JAK2 V617F*-mutaatioprosentin laskemiseen.

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Tarvikkeet ja reagenssit manuaaliseen DNA:n eristämiseen

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit -sarja (tuotenumero 61104)
- Etanolia (96–100 %)
- **Huomautus:** älä käytä denaturoitua alkoholia, koska se sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia.

Tarvikkeet ja reagenssit automaattiseen DNA:n eristämiseen

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

PCR-tarvikkeet ja -reagenssit

- Nukleaasittomia aerosolisuojattuja steriilejä PCR-pipettikärkiä, joissa on hydrofobinen suodatin
- 1,5 ml:n tai 2,0 ml:n nukleaasittomia PCR-putkia
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, Rotor-Gene Q -laitetta varten (tuotenumero 981103 tai 981106)
- Jäätä

Laitteet

- Säädettäviä pipettejä, * jotka on tarkoitettu PCR:ään (1–10 µl; 10–100 µl; 100 – 1 000 µl)
- Kertakäyttökäsineitä
- Vortex-sekoitin
- Lämmitin näytteiden 56 °C:ssa tapahtuvaa lysiä varten
- Pöytämallinen sentrifugi*, jossa on roottori 0,5/1,5/2,0 ml:n reaktioputkia varten (ja joka kykenee saavuttamaan nopeuden 13 000–14 000 rpm)
- Spektrofotometri*

Laite näytteen valmisteluun

- QIASymphony SP -laite (tuotenumero 9001297), ohjelmistoversio 4.0 tai uudempi, sekä laitteen mukana toimitetut tarvikkeet, mukaan lukien Blood_200_V7_DSP-protokolla (tai myöhempi versio)
- Tube Insert 3B (tuki, 2,0 ml v2, näyteteline (24), Qsym, tuotenro 9242083)

Real-time PCR -välineet

- Real-time PCR -laite*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (tuotenro 9002032) tai Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (tuotenro 9002033) sekä toimitetut lisävarusteet
- Asennettu Rotor-Gene AssayManager® -ohjelmiston versio 2.1.x ($x \geq 0$)
- Asennettu Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in -versio 1.0.x ($x \geq 0$)
- tuotu ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR-määritysprofili (AP_ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR_V2_0_x.iap [$x \geq 1$])

* Varmista ennen käyttöä, että laitteet on tarkistettu ja kalibroitu valmistajan suositusten mukaan.


Varoitukset ja varotoimet

Huomaa, että saatat joutua tarkistamaan paikalliset määräykset laitteeseen liittyvien vakavien vaaratilanteiden raportoinnista valmistajalle ja/tai sen valtuutetulle edustajalle ja käyttäjän ja/tai potilaan oleskelumaan toimivaltaiselle viranomaiselle.

Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatieotteista (Safety Data Sheet, SDS). Ne ovat saatavana PDF-tiedostoina Internet-osoitteessa www.qiagen.com/safety. Voit hakea, lukea ja tulostaa kaikkien QIAGEN-tarvikesarjojen ja niiden osien käyttöturvatieotteet.

- Näytteet voivat olla tartuntavaarallisia. Hävitä näyte- ja määritysäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.

<p>HUOMIO</p> 	<p>ÄLÄ lisää valkaisuainetta tai happamia liuoksia suoraan näyte- tai preparointijätteeseen.</p>
---	--

Tiedot hätätilanteeseen

CHEMTREC

Yhdysvaltojen ja Kanadan ulkopuolella +1 703-527-3887

Varotoimet

qPCR-testit edellyttävät hyvien laboratoriokäytäntöjen noudattamista, kuten molekyylibiologiaan käytettävien laitteiden kunnossapitoa sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti.

Tämä sarja on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa. Tämän sarjan mukana toimitetut reagenssit ja ohjeet on validoitu suorituskyvyltään optimaalisiksi.

- Testi on tarkoitettu tehtäväksi kokoverinäytteistä, joiden hyytyminen on estetty kalium-EDTA:lla (K₂-EDTA) ja joita on säilytetty 2–8 °C:ssä korkeintaan 96 tuntia ennen DNA:n eristämistä.
- Kaikki kemikaalit ja biologiset aineet ovat mahdollisesti vaarallisia. Näytteet ovat mahdollisesti tartuntavaarallisia ja niitä on kohdeltava biovaarallisina materiaaleina.
- Hävitä näyte- ja määritysäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan reagenssit on laimennettu optimaalisesti. Älä laimenna reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen.
- Älä käytä alle 25 µl:n reaktiivilavuuksia (reaktioseos + näyte).
- Kaikki *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Älä vaihda mitään yhden sarjan reagenssia toisen *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan samaan reagenssiin, vaikka ne olisivat samasta erästä, koska se voi vaikuttaa suorituskykyyn.
- Katso Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen käyttöoppaasta, Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöoppaasta, Gamma Plug-In -käyttöoppaasta ja QIAasymphony SP -laitteen käyttöoppaasta lisätietoja varoituksista, varotoimista ja toimenpiteistä.
- Inkubaatioajan ja lämpötilan muuttaminen voi tuottaa virheellisiä tai ristiriitaisia tietoja.
- Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Reaktioseoksissa saattaa tapahtua muutoksia, jos ne altistuvat valolle.
- Seosten sekoittuminen JAK2 MT- ja JAK2 WT Quant Standards -reagenssien ja JAK2-mutantti- ja JAK2 WT Control -reagenssien sisältämiin synteettisiin materiaaleihin on estettävä huolellisesti.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta DNA tai PCR-tuote ei aiheuttaisi siirtymiskontaminaatiota ja siitä seuraavaa virheellisesti positiivista signaalia.

- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta ei tapahtuisi DNAasi-kontaminaatiota, joka saattaisi hajottaa malli-DNA:n.
- Käytä reaktioseosten valmistuksessa ja mallien lisäämisessä tarkoitukseen sopivia, erillisiä pipettejä.
- Älä avaa Rotor-Gene Q MDx -instrumenttia, ennen kuin ajo on päättynyt.
- Älä avaa Rotor-Gene Q -putkia, ennen kuin ajo on päättynyt.
- Varmista, että testaat oikean näytteen. Varo väärän näytteen käyttämistä, latausvirhettä ja pipetointivirheitä.
- Varmista näytteiden oikea tunnistus ja jäljitettävyyks käsittelemällä näytteitä järjestelmällisesti.
- Siksi on suositeltavaa noudattaa seuraavia ohjeita:
 - Käytä nukleasittomia laboratoriovälineitä (esimerkiksi pipettejä, pipettien kärkiä, reaktiopulloja) ja käytä käsineitä määritystä tehdessäsi.
 - Käytä kaikissa pipetointivaiheissa uusia aerosolisuojujattuja pipettikärkiä näytteiden ja reagenssien ristikontaminaation välttämiseksi.
 - Valmista esi-PCR-pääseos vain tarkoitukseen varatuilla materiaaleilla (pipetit, kärjet, jne.) erillisellä alueella, jonne ei tuoda DNA-matriiseja (DNA:ta, plasmideja tai PCR-tuotteita). Lisää malli erillisellä alueella (mieluiten erillisessä huoneessa), jolla on tarvittavat materiaalit (pipetit, kärjet ja muut).

Katso QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -eristysjärjan (tuotenumero 61104) ja QIASymphony DSP DNA Mini Kit -eristysjärjan (tuotenumero 937236) turvallisuuteen liittyvät tiedot vastaavasta käsikirjasta.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kaikki kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivämäärää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

Kuljetusolosuhteet

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarja toimitetaan kuivajään päällä. Jos *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja (entsyymiä lukuun ottamatta) ei ole toimitushetkellä jäässä, ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai toimituspakkaus ei sisällä lähetysluetteloa, käsikirjaa tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin paikalliseen tekniseen tukipalveluun tai jälleenmyyjään (katso yhteystiedot takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com).

Säilytysolosuhteet

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on varastoitava välittömästi vastaanoton jälkeen tasaisessa -30...-15 °C:n lämpötilassa olevaan pakastimeen ja suojattava valolta.

Katso QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -eristyssarjan (tuotenumero 61104) ja QIASymphony DSP DNA Mini Kit -eristyssarjan (tuotenumero 937236) varastointiin liittyvät tiedot vastaavasta käsikirjasta.

Käyttöstabiilius

Kyseisissä olosuhteissa säilytetty *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on stabiili laatikon etiketissä mainittuun vanhenemispäivään asti.

Avattuja reagensseja voidaan säilyttää alkuperäispakkauksissaan $-30...-15\text{ °C}$:n lämpötilassa korkeintaan 12 kuukauden ajan. Sarjan toistuvaa sulattamista ja pakastamista on vältettävä. Pakastus-sulatusjaksoja saa olla enintään viisi.

Katso QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -eristyssarjan (tuotenro 61104) ja QIASymphony DSP DNA Mini Kit -eristyssarjan (tuotenro 937236) vakaustiedot niiden omista käsikirjoista.

- Sekoita varovasti kääntämällä putki ylösalaisin 10 kertaa ja sentrifugoimalla kaikki putket entsyymiä lukuun ottamatta ennen avaamista.
- Reagenssien vanhenemispäivät on ilmoitettu kunkin osan merkinnöissä. Oikein säilytetyn tuotteen suorituskyky säilyy putken ja laatikon merkinnässä ilmoitetun stabiiliusajan mukaan.
- **Huomautus:** Eri eristä peräisin olevien putkien sisältöä ei saa sekoittaa keskenään. Kaikkien testaukseen käytettävien *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan osien on oltava peräisin samasta erästä. QIAGEN-yhtiön laaduntarkkailumenettelyihin kuuluu julkaistun pakkauksen toiminnallinen testaus jokaisesta yksittäisestä pakkauksen valmistuserästä. Siksi eri sarjojen reagensseja ei saa sekoittaa edes samasta erästä.

Näytteiden säilytys ja käsittely

Kokoverinäytteet

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit on tarkoitettu käytettäväksi genomisten DNA-näytteiden kanssa, jotka on saatu kalium- EDTA:lla (K₂-EDTA) antikoaguloituista kokoverinäytteistä ja säilytetty jollakin seuraavista tavoista:

- 2–8 °C:ssa enintään 96 tuntia
- 15-25 °C:ssa enintään 96 tuntia
- pakastettuna –30...–15 °C:ssa enintään 1 kuukausi.

Huomautus: Lämpötilanmuutoksia näyteenottoaikassa tapahtuvan varastoinnin ja lähettämisen aikana on vältettävä. Näyteenottoaikan säilytysolosuhteiden pitäisi olla samat kuin kuljetuksen aikana, tai vielä kylmemmät.

Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti tartuntavaarallisina. Hävitä näyte- ja määrittäjäpaikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.

Genomiset DNA-näytteet

Kun genominen DNA on eristetty, DNA-näytteitä voidaan säilyttää ja kuljettaa –30... –15 °C:ssa korkeintaan 24 kuukauden ajan. Useita pakastus-sulatusjaksoja on vältettävä. Pakastus-sulatusjaksoja saa olla enintään neljä.

Protokolla: genomisen DNA:n eristäminen ja valmistelu kokoverestä

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Genominen DNA on eristettävä käyttämällä joko QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjaa (tuotenumero 61104) tai QIASymphony SP -laitetta yhdessä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan kanssa (tuotenumero 937236).
- Varmista, että käytettävät reagenssit eivät ole vanhentuneet ja että ne on kuljetettu ja säilytetty oikeissa olosuhteissa.
- **Huomautus:** *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on validoitu vain QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjan (tuotenumero 61104) tai QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan (tuotenumero 937236) kanssa käytettäväksi. Mitään muuta DNA:n eristämistuotetta ei saa käyttää.

Manuaalinen genomisen DNA:n eristys QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjalla

Manuaalinen genomisen DNA:n eristys tehdään QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjalla (tuotenumero 61104) *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -käsikirjan* ohjeiden mukaan.

Reagenssien käsittely

- Kun valmistele tämän protokollan pesupuskureita, sekoita valmiiksi valmistettu pesupuskuri aina ennen toimenpiteen aloittamista kääntämällä pullo useita kertoja ylösalaisin.
- Käytä pipettikärkiä, jotka eivät muodosta aerosoleja, kun pipetoit eluutiopuskuria pullosta, ja aseta korkki paikalleen välittömästi toimenpiteen jälkeen estääksesi kontaminaation.
- Kun käsittelet viskoosisia nesteitä, ole erittäin huolellinen ja käytä sopivaa pipettiä varmistaaksesi oikeat pipetoitavat määrät.
- Älä kosketa QIAamp Mini -pyörityskolonniputken kalvoa pipetin kärjellä.



- Älä lisää QIAGEN-proteasia (QP) suoraan lyysauspuskuriin (AL).

Ennen kuin aloitat

- Anna verinäytteiden tasaantua huoneenlämpöön (15–25 °C) ja varmista, että näytteet ovat homogenoituneet hyvin.
- Valmistele lyysauspuskuri
Jos lyysauspuskuriin (AL) on muodostunut saostumaa, liuota se inkuboimalla 56 °C:ssa.
- Valmistele QIAGEN-proteasi
Lisää 1,2 ml Protease Solvent (PS) -proteasiliuotinta kylmäkuivatun QIAGEN-proteasin (QP) pulloon ja sekoita huolellisesti. Vältä vaahtoa tekemällä sekoitus kääntämällä pulloa ylösalaisin useita kertoja. Varmista, että QIAGEN-proteasi (QP) on liennut kokonaan.
Huomautus: Älä lisää QP:tä suoraan lyysauspuskuriin (AL).
- Valmistele pesupuskuri 1
Lisää 25 ml etanolia (96–100 %) mittasylinteriä käyttäen pulloon, joka sisältää 19 ml pesupuskuritiivistettä 1 (AW1). Säilytä käyttövalmiiksi saatettu pesupuskuri 1 (AW1) huoneenlämpötilassa (15–25 °C).
Huomautus: Sekoita rekonstruoitu pesupuskuri 1 (AW1) aina kääntämällä pulloa ylösalaisin useita kertoja ennen toimenpiteen aloittamista.
- Valmistele pesupuskuri 2
Lisää 30 ml etanolia (96–100 %) mittasylinteriä käyttäen pulloon, joka sisältää 13 ml pesupuskuritiivistettä 2 (AW2). Säilytä käyttövalmiiksi saatettu pesupuskuri 2 (AW2) huoneenlämpötilassa (15–25 °C).
Huomautus: Sekoita rekonstruoitu pesupuskuri 2 (AW2) aina kääntämällä pulloa ylösalaisin useita kertoja ennen toimenpiteen aloittamista.
- Valmistele eluutiopuskuri
Sarjan mukana toimitetaan yksi pullo eluutiopuskuria (AE). Eluutiopuskurin (AE) kontaminoitumisen estämiseksi on erittäin suositeltavaa käyttää aerosolin syntymisen estäviä pipettikärkiä, kun eluutiopuskuria (AE) -puskuria pipetoidaan pullosta. Lisäksi pullon korkki on asetettava takaisin paikalleen heti käytön jälkeen.

- Anna eluutiopuskurin (AE) -puskurin tasaantua huoneenlämpöön (15–25 °C).
- Aseta lämmitin 56 °C:seen; lämpölevyä käytetään toimenpiteen vaiheessa 4.

Toimenpide

1. Pipetoi 20 µl QIAGEN-proteaasia (QP) lyysiputkeen (LT).

Huomautus: Tarkista rekonstituoidun proteaasin vanhentumispäivämäärä ennen käyttöä.

2. Lisää lyysiputkeen (LT) 200 µl verinäytettä.
3. Lisää lyysiputkeen (LT) 200 µl lyysauspuskuriä (AL), sulje korkki ja sekoita pulssivorteksilla 15 sekunnin ajan.

Huomautus: lyysin takaamiseksi on tärkeää, että näyte ja lyysauspuskuri (AL) ovat sekoittuneet läpikotaisin ja että liuos on homogeeninen.

Huomautus: koska lyysauspuskurin (AL) viskositeetti on suuri, varmista, että lisäät oikean määrän lyysauspuskuriä (AL) pipetoimalla huolellisesti oikeanlaisella pipetillä.



Älä lisää QIAGEN-proteaasia (QP) suoraan lyysauspuskuriin (AL).

4. Inkuboi 56 °C:ssa (± 1 °C) 10 minuutin ajan (± 1 minuutti).
5. Sentrifugoi lyysiputkea (LT) noin 5 sekunnin ajan täydellä nopeudella, jotta pisarat poistuvat korkin sisäpuolelta.
6. Lisää lyysiputkeen (LT) 200 µl etanolia (96–100 %), sulje korkki ja sekoita läpikotaisesti pulssivorteksilla ≥ 15 sekunnin ajan.
7. Sentrifugoi lyysiputkea (LT) noin ≥ 5 sekuntia täydellä nopeudella, jotta mahdolliset pisarat poistuvat korkin sisäpuolelta.
8. Lisää varovasti kaikki vaiheesta 7 saatu lysaatti QIAamp Mini -pyörityskolonniiputkeen kastelematta sen reunaan. Älä kosketa QIAamp Mini -pyörityskolonniiputken kalvoa pipetin kärjellä.

Huomautus: jos käsittelet useita näytteitä, avaa vain yksi lyysiputki (LT) kerrallaan.

9. Sulje QIAamp Mini -pyörityskolonniputken korkki ja käytä sitä sentrifugissa nopeudella n. 6 000 × g 1 minuutin ajan. Aseta QIAamp Mini -pyörityskolonniputki puhtaaseen pesuputkeen (WT) ja heitä suodosta sisältävä putki pois.

Huomautus: jos lysaatti ei ole täysin läpäissyt kalvoa nopeudella 6 000 × g (8 000 rpm) sentrifugoinnin jälkeen, sentrifugoi uudelleen täydellä nopeudella (enintään 20 800 × g) 1 minuutin ajan.

Huomautus: jos lysaatti ei vielääkään läpäise kalvoa sentrifugoinnin aikana, hylkää näyte ja toista eristys ja puhdistus uudella näytemateriaalilla.

10. Avaa QIAamp Mini -pyörityskolonniputki varovasti ja lisää 500 µl pesupuskuria 1 (AW1). Varo kastelemasta putken reunaa. Älä kosketa QIAamp Mini -pyörityskolonniputken kalvoa pipetin kärjellä.

11. Sulje QIAamp Mini -pyörityskolonniputken korkki ja sentrifugoi nopeudella n. 6 000 × g (8 000 rpm) 1 minuutin ajan. Aseta QIAamp Mini -pyörityskolonniputki puhtaaseen pesuputkeen (WT) ja heitä suodosta sisältävä putki pois.

12. Avaa QIAamp Mini -pyörityskolonniputki varovasti ja lisää 500 µl pesupuskuria 2 (AW2). Varo kastelemasta putken reunaa. Älä kosketa QIAamp Mini -pyörityskolonniputken kalvoa pipetin kärjellä.


13. Sulje QIAamp Mini -pyörityskolonniputken korkki ja sentrifugoi täydellä nopeudella (n. 20 000 × g tai 14 000 rpm) 1 minuutin ajan. Aseta QIAamp Mini -pyörityskolonniputki puhtaaseen pesuputkeen (WT) ja heitä suodosta sisältävä putki pois.

14. Sentrifugoi täydellä nopeudella (n. 20 000 × g tai 14 000 rpm) kolmen minuutin ajan, jotta kalvo kuivuisi täysin.

15. Aseta QIAamp Mini -pyörityskolonniputki puhtaaseen eluutioputkeen (elution tube, ET) ja heitä suodosta sisältävä pesuputki (WT) pois. Avaa QIAamp Mini -pyörityskolonniputken korkki varovasti ja lisää 50–200 µl eluutiopuskuria (AE) kalvon keskelle. Sulje korkki ja inkuboi huoneenlämpötilassa (15–25 °C) 1 minuutin ajan. Käytä sentrifugissa nopeudella n. 6 000 × g (8 000 rpm) 1 minuutin ajan DNA:n eluomiseksi.

16. Hävitä käytetyt näyteputket, levyt ja jäte paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.

Automaattinen genomisen DNA:n uutto QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjalla

Automaattinen genomisen DNA:n eristys on tehtävä QIASymphony-laitteen näytteen valmistelumuodulilla (sample preparation, SP) yhdessä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan (tuotenumero 937236) kanssa ja noudattamalla *QIASymphony DSP DNA Kit-käsikirjan* ohjeita. *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* -sarjan kanssa käytettävät protokollaominaisuudet on korostettu alla olevassa toimenpideselosteessa merkillä .

QIASymphony SP:n avulla QIASymphony DSP DNA Mini Kit mahdollistaa automaattisen DNA:n puhdistuksen ihmisen kokoverestä (käyttämällä Blood_200_V7_DSP-protokollaa [tai myöhempää] QIASymphony SP -laitteessa).

- Esikäsittelyä ei tarvita.
- Putket siirretään suoraan QIASymphony SP -laitteeseen.
- DNA:n puhdistus tapahtuu magneettisten hiukkasten avulla.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

-  Eristettävä kokoverimäärä on 300 µl.

Valmistelu

- Varmista, että tiedät, miten QIASymphony SP -instrumenttia käytetään. Katso käyttöohjeet laitteen mukana toimitetuista käyttöoppaista.

Reagenssien käsittely

- Ennen kuin käytät reagenssikasettia ensimmäistä kertaa, tarkista, että Buffer QSL1- ja Buffer QSB1 -puskureissa ei ole saostumaa. Tarvittaessa poista Buffer QSL1- ja Buffer QSB1 -puskureita sisältävät urat reagenssikasetista ja inkuboi 30 minuutin ajan 37 °C:ssa välillä ravistaen, jotta saostuma liukenisi. Varmista, että asetat urat takaisin oikeaan paikkaan. Jos reagenssikasetti on jo puhkaistu, varmista, että urat on tiivistetty uudelleenkäytettävillä tiivisteliuskoidella, ja inkuboi koko reagenssikasettia 30 minuutin ajan 37 °C:ssa välillä ravistaen vesihauteessa.
- Yritä välttää reagenssikasetin (Reagent Cartridge, RC) voimakasta ravistelua, sillä se voi johtaa vaahtoutumiseen, joka saattaa vaikeuttaa nestetason detektointia.

Kunnossapito

- QIASymphony SP -laitteen valinnainen ylläpito ei ole välttämätöntä, mutta se on erittäin suositeltavaa kontaminaatorisikin vähentämiseksi.

Ennen kuin aloitat

- Varmista ennen toimenpiteen aloittamista, että magneettiset hiukkaset ovat suspendoituneet täysin. Käytä magneettisia hiukkasia sisältävää kaukaloa voimakkaasti vortex-laitteessa vähintään 3 minuutin ajan ennen ensimmäistä käyttökertaa.
- Varmista, että reagenssikasetin päälle on asetettu puhkaisukansi ja että magneettipartikkelien uran kansi on poistettu, tai, jos reagenssikasetti on osittain käytetty, varmista, että uudelleenkäytettävät tiivisteliuskat on poistettu.
- Muista avata entsyymiputket.
- Jos näytteet on viivakoodattu, suuntaa näytteet putkitelineessä siten, että viivakoodit ovat kohti QIASymphony SP -laitteen vasemmalla puolella olevaa viivakoodinlukijaa.

Toimenpide

1. Sulje kaikki lokerot ja kuomu.
2. Kytke QIASymphony SP:n virta; odota, kunnes Sample Preparation (Näytteen valmistelu) -näyttö tulee näkyviin ja alustusprosessi on päättynyt.

Huomautus: Virtakytkin on QIASymphony SP -laitteen vasemmassa alakulmassa.

3. Kirjautu sisään instrumenttiin.
4. Varmista, että Waste (Jäte) -lokero on valmisteltu asianmukaisesti, ja tutki sen sisältö, mukaan lukien kärkikouru ja nestemäisen jätteen säiliö. Vaihda kärkien jätetpussi tarvittaessa.
5. Lataa tarvittava eluutioline Eluate (Eluaatti) -lokeroon.

Tärkeää: Älä lataa 96-kuoppaista levyä aukkaan Elution slot 4 (Eluutioaukko 4).

Käytä vain aukkoa Elution slot 1 (Eluutioaukko 1) ja vastaavaa jäähdytyssovitinta.

Huomautus: Kun käytät 96-kuoppaista levyä, varmista, että levyn suunta on oikea, koska virheellinen suunta voi aiheuttaa näytteiden sekaantumista myöhemmässä analyysissä.

6. Lataa vaadittavat reagenssikasetit ja kulutustarvikkeet Reagents and Consumables (Reagenssit ja kulutustarvikkeet) -lokeroon.

Huomautus: Varmista, että pipetointikärjet on kiinnitetty oikein.

7. Tee inventaarioskannaus Reagents and Consumables (Reagenssit ja kulutustarvikkeet) -lokerosta.



8. Siirrä **300 µl** eristettävää kokoverinäytettä nukleasittomaan mikroputkeen (2,0 ml, tyyppi H) ja aseta se putkitelineen 3b 2 ml:n sovittimeen. Lataa näyteputket Sample (Näyte) -lokeroon.

9. Käytä kosketusnäyttöä ja kirjoita tarvittavat tiedot jokaisesta käsiteltävästä näyte-erästä:
 - **Näytetiedot:** Muuta putken oletusmuoto. Tee se valitsemalla Select All (Valitse kaikki). Valitse sitten **Tube Insert** -lomakkeesta **Sarstedt reference 72.694** (Sarstedt-viite 72.694).
 - **Ajettava protokolla:** Valitse **Select All** (Valitse kaikki). Valitse sitten kategoriasta **DNA Blood** (DNA Veri) > **Blood_200_V7_DSP** (tai myöhempi versio) kokoverinäytteelle.



- **Eluutiotilavuus ja ulostulosijainti:** valitse kokoveriprotokollalle vaihtoehto 100 µl.

Huomautus: Kun erän tiedot on syötetty, tila **LOADED** (LADATTU) muuttuu tilaksi **QUEUED** (JONOSSA). Heti kun jokin erä on jonossa, Run (Aja) -painike tulee näkyviin.

10. Aloita ajo.

10a. Aloita ajo valitsemalla **Run** (Aja).

10b. Lue ja vahvista näyttöön tuleva viesti.

Huomautus: On suositeltavaa odottaa instrumentin luona, kunnes se on tunnistanut sisäisten kontrolliputkien nestetaso ja QIAsymphony SP -laitteen kuljettimen tilaksi muuttuu **RUNNING** (AJO MENEILLÄÄN).

Tärkeää: Älä keskeytä tai lopeta ajoa käsittelyn aikana (paitsi hätätilanteessa), koska tällöin näytteet saavat merkinnän "unclear" (epäselvä).

Huomautus: Näytteitä voi ladata jatkuvasti ja lisätä niitä tähän ajoon (siihen asti kunnes reagenssit on ladattu).

11. Aloita puhdistus valitsemalla **Run** (Aja).

12. Protokolla-ajon lopuksi erän tila **RUNNING** (AJO MENEILLÄÄN) muuttuu tilaksi **COMPLETED** (VALMIS). Ota puhdistetut nukleiinihapot sisältävä eluutioline Eluate (Eluaatti) -lokerosta.

On suositeltavaa poistaa eluaattilevy Eluate (Eluaatti) -lokerosta heti ajon päättymisen jälkeen. Jos eluutiotevyt jätetään QIAsymphony SP -laitteeseen ajon päätyttyä, niihin saattaa tiivistyä kosteutta tai niistä saattaa haihtua kosteutta.

Huomautus: Magneettiset hiukkaset eivät yleensä kulkeudu eluaatteihin. Jos jossakin eluaatissa on mustia magneettisia hiukkasia, voit poistaa ne seuraavasti:

12a. Aseta DNA:ta sisältävä putki sopivaan magneettiseen erottimeen (esimerkiksi QIAGEN 12-Tube Magnet, tuotenumero 36912), kunnes magneettiset hiukkaset on eroteltu.

- 12b. Jos DNA on mikrolevyissä, aseta mikrolevy sopivaan magneettiseen erottelulaitteeseen (esimerkiksi QIAGEN 96-Well Magnet Type A, tuotenumero 36915), kunnes magneettiset hiukkaset on eroteltu. Jos mitään sopivaa magneettista erotinta ei ole käytettävissä, sentrifugoi DNA:ta sisältävää putkea mikrosentrifugissa 1 minuutin ajan täydellä nopeudella, jotta magneettisista hiukkasista muodostuisi pelletti.
13. Vie QIAsymphony SP -tulostiedosto: tämä raportti luodaan jokaiselle eluutioplevyille.
- 13a. Aseta USB-muistitikku johonkin QIAsymphony SP -laitteen etuosassa olevaan USB-porttiin.
- 13b. Valitse **Tools** (Työkalut).
- 13c. Valitse **File Transfer** (Tiedostojen siirto).
- 13d. Valitse In-/Output Files (Syöte-/tulostiedostot) -välilehdestä **Results Files** (Tulostiedostot) > **Transfer** (Siirrä).
- Viedyn tiedoston nimen pitäisi olla seuraavassa muodossa:
vvv-kk-pphh:mm:ss_eluutiolineen tunnus
14. Tarkista QIAsymphony SP -tulostiedostosta Validity of result (Tuloksen kelvollisuus) -sarake jokaisen näytteen osalta.
- **Valid (Hyväksytty)- ja Unclear (Epäselvä) -tila:** Jatka kohtaan DNA:n kvalifointi ja kvantifointi.
 - **Invalid (Virheellinen) -tila:** Näyte on hylätty. Käsittele eristysvaihe uudelleen.
15. Jos reagenssikasetti on käytetty vain osittain, tiivistä se uudelleenkäytettävillä tiivisteliuksilla ja sulje proteinaasi K:ta sisältävät putket kierrekorkeilla heti protokollan päätyttyä, jotta niistä ei haihdu nestettä.
16. Hävitä käytetyt näyteputket, levyt ja jäte paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.
17. Puhdista QIAsymphony SP -laite.
- Noudata instrumentin mukana toimitettujen käyttöoppaiden huolto-ohjeita. Muista puhdistaa kärkien suojukset säännöllisesti ristikontaminaation välttämiseksi.
18. Sulje instrumentin lokerot ja katkaise QIAsymphony SP -laitteen virta.

DNA:n kvalifiointi ja kvantifiointi

Tyhjää ATE- tai AE-puskuria on käytettävä kalibroimaan spektrofotometri. Näiden puskureiden käyttäminen on tarpeen, koska genomisen DNA:n eristysarjoissa käytetyt eluutiopuskurit sisältävät säilöntäaineena natriumatsidia, joka absorboituu 260 nm:ssä.

- A_{260}/A_{280} -suhteen täytyy olla $\geq 1,7$, koska pienemmät suhteet ovat yleensä merkki proteiinin kontaminaatiosta tai orgaanisten kemikaalien esiintymisestä ja vaikuttavat PCR-vaiheeseen.
- DNA:n määrä selvitetään mittaamalla optinen tiheys 260 nm:ssä.
- Puhdistetun DNA:n kokonaismäärä = pitoisuus \times näytteen tilavuus (μ l).
- Jos A_{260}/A_{280} -suhde on pienempi kuin 1,7 ja/tai jos genomisen DNA:n pitoisuus on alle 10 ng/ μ l, näytettä ei saa käsitellä enempää.

Genomisten DNA-näytteiden normalisointi

Laimenna DNA:n pitoisuudeksi 10 ng/ μ l TE-puskurissa, joka on toimitettu *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan mukana.

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-laitteen jokainen PCR-reaktio on optimoitu 50 ng:lle puhdistettua genomista DNA:ta, jolloin näytteen lopullinen laimennettu tilavuus on 5 μ l. Jokaista testinäytettä varten tarvitaan yhteensä 100 ng näytettä sekä mutantin että villityypin reaktioiden suorittamista varten.

Protokolla: qPCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on ajettava Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella ja tulokset on tulkittava automaattisesti Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistolla.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja edellyttää erityistä Gamma Plug-in -lisäosaa. Tämän lisäosan voi ladata QIAGEN-verkkosivuilta: resources.qiagen.com/674623. Tämä lisäosa on asennettava tietokoneeseen, jolla on jo Rotor-Gene AssayManager v2.1 asennettuna.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan kanssa tarvitaan myös määritysprofiili. Määritysprofiili (.iap-tiedosto) sisältää kaikki parametrit, joita tarvitaan qPCR-testin sykleihin ja analyysiin. Se voidaan ladata *ipsogen* JAK2 RGQ PCR -sarjan omilta sivuilta QIAGEN-verkkosivuilta: resources.qiagen.com/674623. Määritysprofiili on tuotava Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon.
- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Katso lisätietoja laitteen, Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston ja Gamma Plug-in -lisäosan käyttöoppaista.
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 mahdollistaa PCR-tulosten automaattisen tulkinnan. Sykliparametrit ovat lukittuina ajon aikana.

Valmistelu

- Lataa ja asenna Rotor-Gene AssayManager v2.1. Lue tarkat tiedot kohdasta Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ydinohjelmiston asennus sivulta 38.
- Lataa ja asenna Gamma Plug-in. Katso lisätiedot kohdasta Gamma Plug-in -lisäosan asentaminen ja määritysprofiilin tuominen sivulta 39.
- On suositeltavaa testata kahdeksaa genomisen DNA:n näytettä samassa kokeessa, jotta kontrollien, standardien ja reaktioseosten käyttö olisi optimaalista. Lue tarkat tiedot kohdasta Näytteiden käsittely Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteessa, jossa on 72 putken roottori sivulta 42.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ydinohjelmiston asennus

Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto on asennettava Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen liitetyle tietokoneelle. Sen voi ladata QIAGEN-verkkosivuilta osoitteesta resources.qiagen.com/674623. Katso tietoa Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core -ohjelmiston asentamisesta, mukaan lukien tietokonetta koskevat vaatimukset, *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöoppaasta*.

Huomautus: *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja voidaan ajaa vain, kun tietyt asetukset on ohjelmoitu Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistossa.

Koko järjestelmän prosessiturvallisuuden vuoksi seuraavat pakolliset asetukset on määritettävä suljetun toimintatilan mukaisiksi:

- Material number required (Materiaalinumero pakollinen)
- Valid expiry date required (Kelvollinen vanhenemispäivä pakollinen)
- Lot number required (Eränumero pakollinen)

Gamma Plug-in -lisäosan asentaminen ja määrittämisprofiilin tuominen

Gamma Plug-in -lisäosan ja määrittämisprofiilin asennus ja tuonti on selostettu *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöoppaassa* ja *Gamma Plug-in -käyttöoppaassa*.

Gamma Plug-in -lisäosan asentaminen


1. Lataa sekä Gamma Plug-in että viimeisin *ipsogen JAK2 CE IVDR* -määrittämisprofiilin versio QIAGENin verkkosivuilta.
2. Kaksoisnapsauta **RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_x** .msi -tiedostoa (jossa $x \geq 0$).
Noudata asennusohjeita.

Yksityiskohtaisia tietoja tästä prosessista on julkaisun *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöoppaan* osassa *Installing Plugins* (Lisäosien asentaminen).

Huomautus: Koko järjestelmän prosessiturvallisuuden vuoksi määritä suljettu toimintatila valitsemalla *Settings (Asetukset)* -välilehden osiosta *Work list (Työluettelo)* valintaruudut **Material number required** (Materiaalinumero pakollinen), **Valid expiry date required** (Kelvollinen vanhenemispäivä pakollinen) ja **Lot number required** (Eränumero pakollinen). Jos valintaruutuja ei ole jo valittu, valitse ne napsauttamalla.

3. Lisäosan onnistuneen asennuksen jälkeen käyttäjän, jolla on *Rotor-Gene AssayManager v2.1* -ohjelmiston järjestelmänvalvojan oikeudet, on tuotava *ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR* -määrittämisprofiili seuraavalla tavalla:

ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR-määrittämisprofiilin tuominen

1. Avaa ohjelmisto napsauttamalla *Rotor-Gene AssayManager v2.1* -ohjelmiston kuvaketta .
2. Kirjaudu *Closed (Suljettu)* -toimitilaan käyttäjänä, jolla on järjestelmänvalvojan oikeudet (kuva 3).
Kirjautumisikkuna avautuu (kuva 4).



Rotor-Gene AssayManager

2.1.0.7

User ID

Password

Mode
Closed

1

OK Cancel

Kuva 3. Rotor-Gene AssayManager -kirjautumisikkuna. 1: Closed (Suljettu) -toimitila.

Available work lists | Manage or apply work lists

Manually created work lists

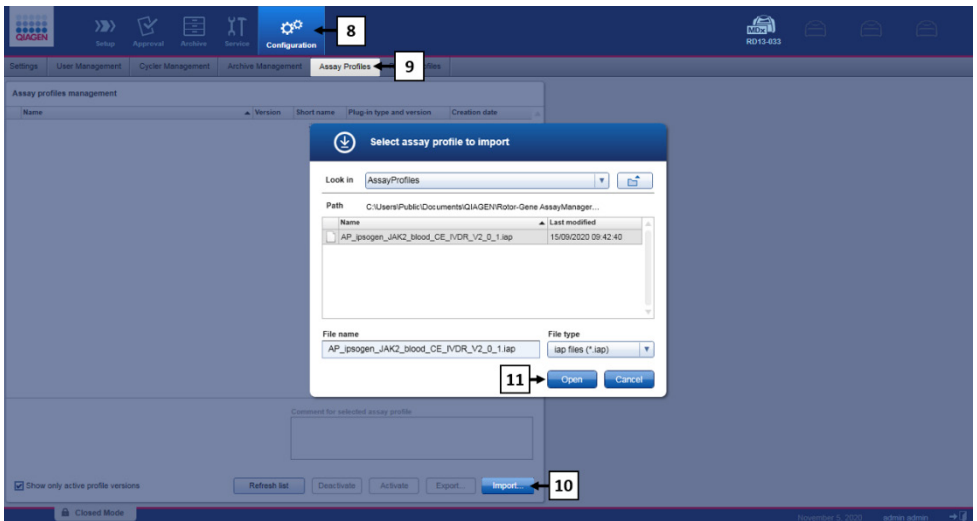
Work list name	# samp.	Assay profiles	Rotor type	Volume	Author	Creation date	Actions	Apply
20200914_JAK2_testing	3	JAK2_B	72-Well Rotor	25 µl	admin	2019/02/20 17:09:42	[Icons]	[Apply]

Automatically generated work lists

2: Setup (Asetukset) -ympäristö. 3: Approval (Hyväksyntä) -ympäristö. 4: Archive (Arkisto) -ympäristö. 5: Service (Huolto) -ympäristö. 6: Configuration (Konfigurointi) -ympäristö. 7: Rotor-Gene Q -kuva.

Kuva 4. Rotor-Gene AssayManager v.2.1.1. 2: Setup (Asetukset) -ympäristö. Käytetään työluetteloiden luomiseen, hallintaan ja käyttöönottoon. 3: Approval (Hyväksyntä) -ympäristö. Käytetään vapauttamattomien tai osittain vapautettujen kokeilujen hakuun ja tiettyjen näytteiden hyväksyntään. Kokeiluraportit luodaan näytteen vapauttamisen yhteydessä. 4: Archive (Arkisto) -ympäristö. Käytetään täysin tai osittain vapautettujen kokeilujen hakemiseen ja uudelleenkäytettävien tietojen välilehdet. 6: Configuration (Konfigurointi) -ympäristö. Käytetään Rotor-Gene AssayManager -asetusten määrittämiseen. 7: Rotor-Gene Q -kuva. Käytetään ajon keskeyttämiseen ja lopettamiseen ja vapauttamaan PCR-laite ajon lopettamisen jälkeen (sekä laitteen yhteyksien tarkistamiseen).

3. Valitse Configuration (Konfigurointi) -ympäristö (Kuva 4, laatikko 6) (Kuva 5, laatikko 8).
4. Napsauta Assay Profiles (Määrittäprofiilit) -välilehteä (Kuva 5, laatikko 9).
5. Valitse **Import** (Tuo) (Kuva 5, laatikko 10).
6. Valitse Select assay profile to import (Valitse tuotava määrittäprofiili) -ikkunassa ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR-määrittäprofiili. Valitse **Open** (Avaa) (Kuva 5, laatikko 11).



Kuva 5. Määrittäprofiilin tuonti. 8: Configuration (Määrittä) -ympäristö, 9: Assay Profiles (Määrittäprofiilit) -välilehti, 10: Import (Tuo) -painike, 11: Open (Avaa) -painike.

7. Kun määrittäprofiilin tuonti on valmis, sitä voidaan käyttää Setup (Asetukset) -ympäristössä (Kuva 4, laatikko 2).

Huomautus: Määrittäprofiilin samaa versiota ei voi tuoda kahdesti.

Näytteiden käsittely Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteessa, jossa on 72 putken roottori

On suositeltavaa testata kahdeksaa genomisen DNA:n näytettä samassa kokeessa, jotta kontrollien, standardien ja reaktioseosten käyttö olisi optimaalista.

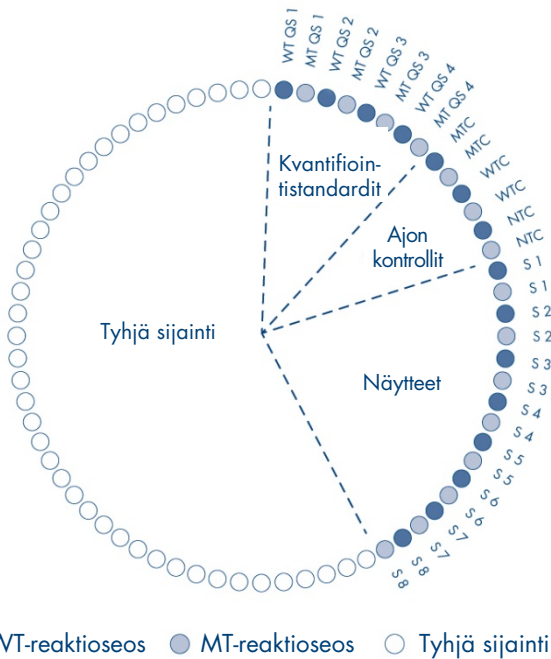
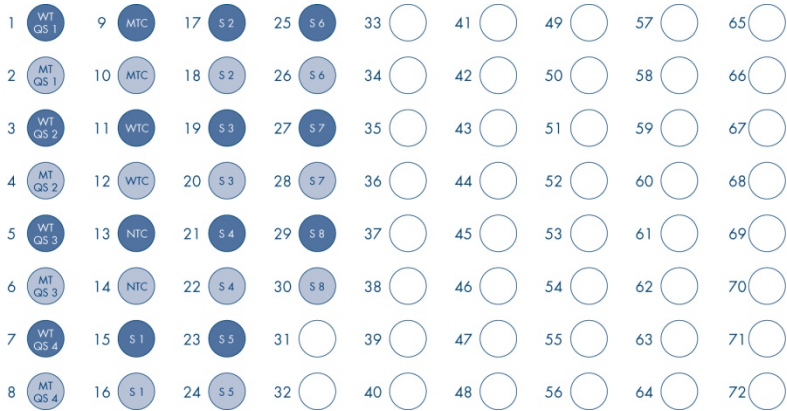
Taulukko 3 sisältää reaktioiden määrän, joka voidaan ajaa 72 putken roottorilla.

Kaavio kuvassa 6 esittää esimerkin latauslohkon ja roottorin asetuksista *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla tehtävässä kokeessa.

Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

Taulukko 3. Reaktioiden määrä Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Näytteet	Reaktioiden määrä
JAK2-mutanttireaktioseos	
8 genomisen DNA:n näytettä	8
JAK2-mutaation kvantifiointistandardit (mutantti)	4
JAK2-mutanttikontrolli (mutantti)	1
JAK2-villityypin kontrolli (villityyppi)	1
Vettä mallittomaan kontrolliin (NTC)	1
JAK2-villityypin reaktioseos	
8 genomisen DNA:n näytettä	8
JAK2-villityypin kvantifiointistandardit (villityyppi)	4
JAK2-mutanttikontrolli (mutantti)	1
JAK2-villityypin kontrolli (villityyppi)	1
Vettä mallittomaan kontrolliin (NTC)	1



Kuva 6. Levyn ja roottorin asetukset tehtävässä koetta ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla. WTC: JAK2-villityypin kontrolli; MTC: JAK2-mutanttikontrolli; WT-QS: JAK2-villityypin kvantifiointistandardit; MT-QS: JAK2-mutaation kvantifiointistandardit; S: genomisen DNA:n näyte; NTC: malliton kontrolli (vesi).



Putket on asetettava roottoriin kuvan 6 mukaisesti, koska määrittämisprofiilissa määritetty automaattinen analyysi perustuu tähän järjestykseen. Jos järjestys on erilainen, tuloksista tulee poikkeavia.

Huomautus: Kaikki käyttämättömät paikat on täytettävä tyhjillä, korkilla suljetuilla liuskaputkillä.

qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteessa, jossa on 72 putken roottori

Ennen kuin aloitat:

- Luo työluettelo käsiteltävistä näytteistä.

Työluettelon luominen

1. Kytke Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen virta.
2. Avaa Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto ja kirjaudu käyttäjänä, jolla on suljetun tilan käyttöoikeudet (kuva 3, laatikko 1).
3. Tarkista, että ohjelmisto on tunnistanut Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen oikein, ennen kuin aloitat ajon (kuva 7).



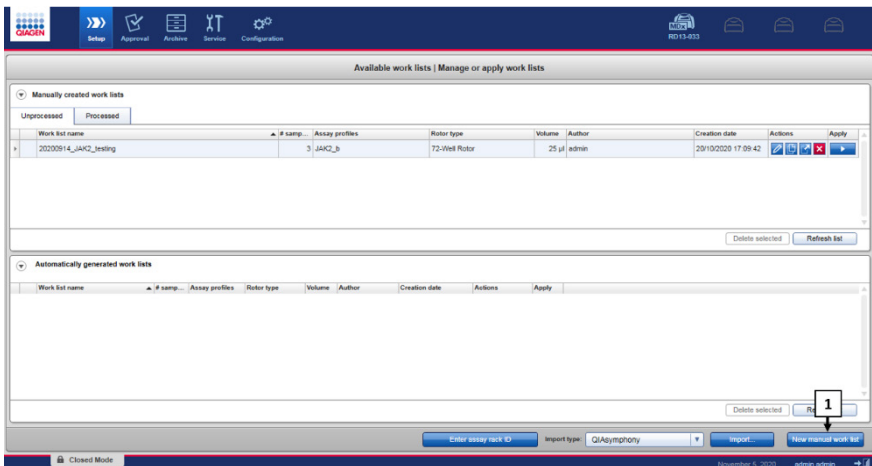
Ei yhdistetty



Yhdistetty

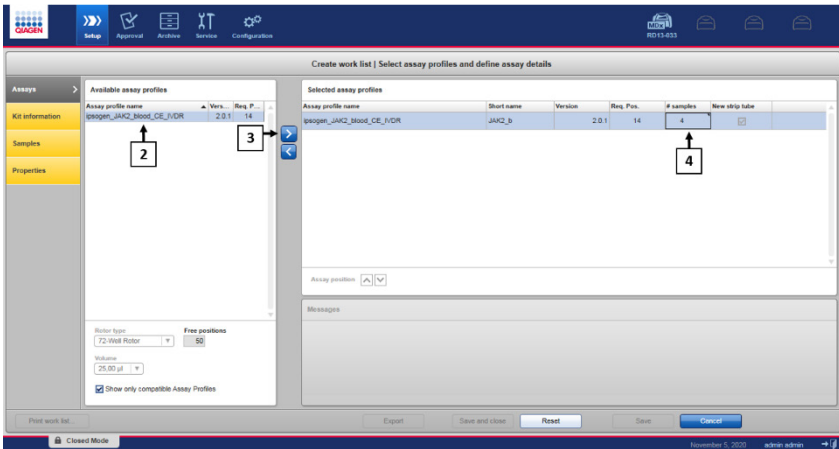
Kuva 7. Rotor-Gene Q -laitteen yhdistyksen tila.

4. Valitse asetussympäristössä **New manual work list** (Uusi käsin lisättävä työluettelo) (kuva 8, laatikko 1).



Kuva 8. Työluettelon luonti. 1: Uuden työluettelon luontipainike.

5. Valitse **ipsogen_JAK2_blood_CE_IVDR**-määritysprofiili käytettävissä olevien määritysprofiilien luettelosta Assay (Määritys) -vaiheesta (kuva 9, laatikko 2).



Kuva 9. Työluettelon luonti – Määritysprofiilin valinta. 2: Käytettävissä olevat määritysprofiilit. 3: Määritysprofiilin siirtäminen työluetteloon. 4: Kirjoita näytteiden määrä.

6. Siirrä valittu määritysprofiili **Selected assay profiles** (Valitut määritysprofiilit) -luetteloon valitsemalla > (kuva 9, laatikko 3). Määritysprofiilin pitäisi nyt näkyä **Selected assay profiles** (Valitut määritysprofiilit) -luettelossa.
7. Kirjoita näytteiden lukumäärä soveltuvaan kenttään (kuva 9, laatikko 4).
8. Valitse Kit information (Sarjan tiedot) -vaihe ja kirjaa käsin seuraavat JAK2-sarjan tiedot, jotka on painettu laatikon kanteen:
- o materiaalinumero 1120216 (kuva 10, laatikko 6)
 - o kelvollinen vanhenemispäivä (kuva 10, laatikko 7)
 - o eränumero (kuva 10, laatikko 8).

Huomautus: vaihtoehtoisesti voit kirjata tai lukea sarjan viivakoodin (kuva 10, laatikko 5).

Huomautus: Kaikki kentät on täytettävä. Kenttä muuttuu siniseksi, kun siihen on annettu kelvollinen tieto (sarja ei ole vanhentunut, kelvollinen materiaali- ja eränumero on annettu).

Kuva 10. Työluettelon luominen – sarjan tietojen kirjaaminen. 5: Kit bar code (Sarjan viivakoodi) (voidaan lukea lukulaitteella tai kirjoittaa käsin; jos viivakoodi annetaan, kentät täyttyvät automaattisesti) 6: Material number (Materiaalinumero). 7: Kit expiry date (Sarjan viimeinen käyttöpäivä). 8: Lot number (Eränumero). Tämä tieto on merkitty sarjan pakkaukseen.

9. Napsauta Samples (Näytteet) -vaihtetta.

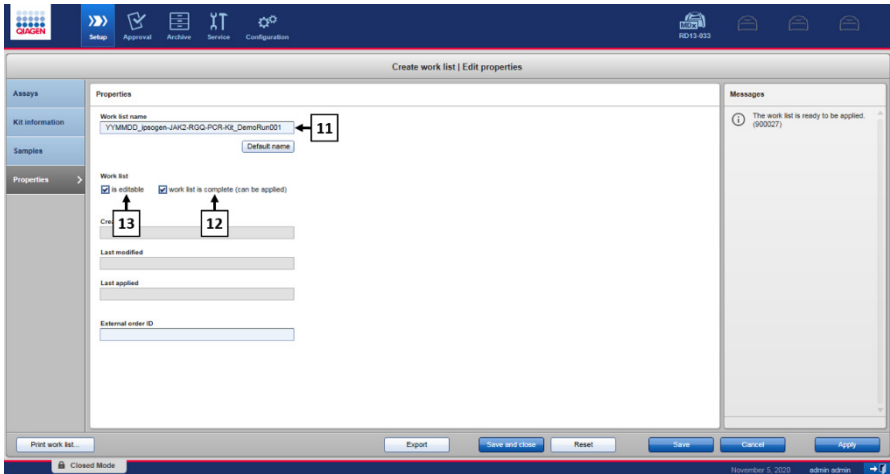
Näkyviin tulee luettelo näytteen tiedoista. Luettelo edustaa roottorin odotettua asetelua.

10. Kirjoita tähän luetteloon näytteen tunnistenumerot (ID) (kuva 11, laatikko 9) sekä mahdolliset muut valinnaiset näytetiedot (kuva 11, laatikko 10) kommenttina jokaisen näytteen kohdalle.

Pk.	Style	Sample ID	Status	Sample type	Targets	Assay	Sample comment
2					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	
3	GS2			OS	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
4					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	
5	GS3			OS	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
6					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	
7	GS4			OS	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
8					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	
9		MutantControl		PC	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
10		WildTypeControl		PC	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
11					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	
12					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	
13		NTC		NTC	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
14					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	
15		Sample 1		Text	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
16					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	
17		Sample 2		Text	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
18					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	
19		Sample 3		Text	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
20					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	
21					FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
22					FAM_MT_HEX_MT	JAK2_b	

Kuva 11. Työluettelon luominen – näytteen tietojen kirjaaminen. 9: Näytetunnus. 10: Näytteen kommentti (valinnainen)

11. Napsauta Properties (Ominaisuudet) -vaihetta. Kirjoita työluettelon nimi (kuva 12, laatikko 11).
12. Valitse **work list is complete** (can be applied) (työluettelo on valmis [voidaan käyttää] -valintaruutu (kuva 12, laatikko 12).



Kuva 12. Työluettelon luominen – ominaisuudet. 11: Työluettelon nimi. 12: Valitse work list is complete (työluettelo on valmis). 13: Poista valinta is editable (voi muokata) -ruudusta vain, jos työluetteloa ei saa muuttaa.

Huomautus: is editable (voi muokata) -valintaruutu (kuva 12, laatikko 13) määrittää, voiko työluetteloa muokata myöhemmin. Jos työluettelo on käytettävissä eikä sitä ole tarkoitus muuttaa myöhemmin, poista valinta **is editable** (voi muokata) -valintaruudusta.

13. Tallenna työluettelo.
14. Työluettelo voidaan tulostaa ja tämä voi auttaa qPCR:n valmistelussa ja asetusten määrittämisessä. Jos haluat tulostaa työluettelon, valitse **Print work list** (Tulosta työluettelo). Työluettelossa näkyvät myös näytteen tiedot.

Huomautus: työluettelo voidaan tallentaa ja ajaa myöhemmin tai se voidaan luoda samalla, kun koe ladataan instrumenttiin, ja käyttää suoraan kokeen kanssa.

Toimenpide

qPCR-kokeen määrittäminen

1. Sulata kaikki tarvittavat komponentit paitsi *Taq*-DNA-polymeraasi; kyseistä entsyymiä on säilytettävä pakastimessa, kun sitä ei käytetä. Aseta putket, joissa sulatettavat komponentit ovat, jäähäuteeseen.

Tärkeää: Älä anna komponenttien sulaa yli 30 minuuttia, jotta materiaali ei pilaannu.

2. Puhdista työpöydän alue, jossa PCR-seos valmistellaan, jotta malli- tai nukleasikontaminaation riski pienenee.
3. Sekoita varovasti standardit, kontrollit ja reaktioseokset sisältäviä putkia kääntämällä niitä ylösalaisin 10 kertaa ja sentrifugoimalla ennen käyttöä.
4. Valmista seuraavat qPCR-päaseokset käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Huomautus: Kaikki pitoisuudet koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukossa 4 ja taulukossa 5 esitetään pipetointijärjestys yhden MT-reagenssiseoksen ja yhden WT-reagenssiseoksen valmistusta varten. Laskelma perustuu lopulliseen reaktiomäärään 25 µl. Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista sekä 8 näytteen ja kontrollien sisällyttämistä varten.

Taulukko 4. qPCR-päaseosten valmistaminen JAK2 MT -sekvenssin tunnistusta varten

Komponentti	1 reaktio (µl)	15 + 1* reaktiota (µl)	Lopullinen pitoisuus
JAK2-mutanttireaktioseos	19,8	316,8	1x
<i>Taq</i> DNA -polymeraasi	0,2	3,2	1x
Näyte (lisätään vaiheessa 6)	5	5 kutakin	–
Kokonaismäärä	25	25 kutakin	–

* Ylimääräinen reaktiotilavuus on sisällytettyinä kuolleena tilavuutena.

Taulukko 5. qPCR-pääseosten valmistaminen JAK2 WT -sekvenssin tunnistusta varten

Komponentti	1 reaktio (µl)	15 + 1* reaktiota (µl)	Lopullinen pitoisuus
JAK2-villityypin reaktioseos	19,8	316,8	1x
Taq DNA -polymeraasi	0,2	3,2	1x
Näyte (lisätään vaiheessa 6)	5	5 kutakin	–
Kokonaismäärä	25	25 kutakin	–

* Ylimääräinen reaktiotilavuus on sisällytettyinä kuolleena tilavuutena.

Tärkeää: Käytä vortex-laitteessa ja lyhyesti sentrifugissa qPCR-pääseos ennen kuin jaat sitä 20 µl kuhunkin liuskaputkeen.

- Lisää mallittoman kontrollin vesi (NTC) soveltuviin putkiin ja sulje putket.
- Tärkeää:** Käytä vortex-laitteessa ja lyhyesti sentrifugissa DNA (genomisen DNA:n näytteet sekä QS ja kontrollit). Lisää sen jälkeen 5 µl kvantifioitavaa materiaalia soveltuvaan liuskaputkeen, jolloin kokonaistilavuudeksi tulee 25 µl. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.

Huomautus: Ole huolellinen, että vaihdat kärjet kunkin putken jälkeen epäspesifisen mallin tai reaktioseoksen kontaminaation ja niiden aiheuttamien virheellisten positiivisten tulosten välttämiseksi. Aloita lisäämällä testinäytteet, standardit ja lopuksi kontrollit.

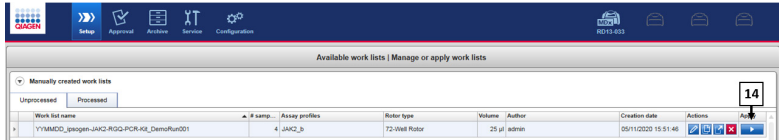
- Palauta kaikki *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan komponentit pakastimeen, jotta materiaali ei pilaannu.

Ajon aloittaminen

- Valmistele Rotor-Gene Q MDx ja aloita ajo seuraavasti.
 - Aseta 72-well rotor Rotor-Gene Q MDx -roottoripitimeen.
 - Aseta liuskaputket roottoriin oikeisiin sijainteihinsa; aloita sijainnista 1 kuvan 6 (sivu 43) esittämällä tavalla. Aseta kaikkiin käyttämättömiin sijainteihin tyhjä, korkilla suljettu putki.

Huomautus: Varmista, että ensimmäinen putki on asetettu paikkaan 1 ja että liuskaputket on asetettu oikeisiin suuntiin ja paikkoihin kuvassa 6 esitetyllä tavalla.

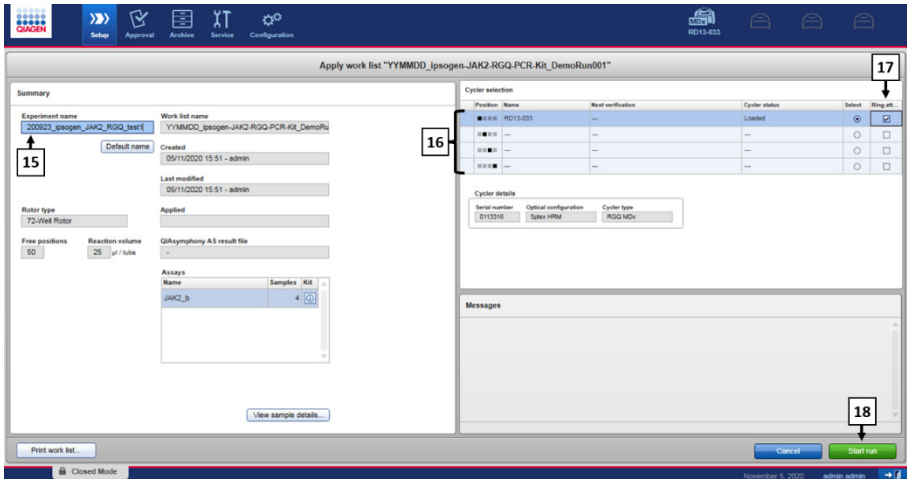
- 1c. Kiinnitä lukitusrengas.
- 1d. Lataa roottori ja lukitusrengas Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ja sulje laitteen kansi.
- 1e. Valitse Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistossa joko vastaava työluettelo työluetteloiden hallinnasta ja valitse **Apply** (Käytä) (kuva 13, laatikko 14) tai, jos työluettelo on vielä auki, valitse **Apply** (Käytä).



Kuva 13. Ajon asetukset – työluettelon valitseminen. 14: Apply (Käytä) -painike.

Huomautus: jos kokeen omaa työluettelo ei ole luotu, kirjaudu Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmiin ja noudata kohdan Työluettelon luominen, sivu 45 ohjeita ennen kuin jatkat seuraavien ohjeiden mukaan.

- Kirjoita kokeen nimi (kuva 14, laatikko 15).
- Valitse käytettävä PCR-laite **Cycler selection** (PCR-laitteen valinta) -luettelossa (kuva 14, laatikko 16).
- Tarkista, että lukitusrengas on kiinnitetty oikein ja vahvista näytössä, että lukitusrengas on kiinnitetty (kuva 14, laatikko 17).
- Valitse **Start run** (Aloita ajo) (kuva 14, laatikko 18).



Kuva 14. Ajon asetukset – ajon asetukset. 15: Kokeen nimi. 16: PCR-laitteen valinta. 17: Varmista, että lukitusrengas on paikallaan ja kiinni. 18: Start run (Aloita ajo) -painike.

1f. JAK2 RGQ PCR -ajon pitäisi alkaa.

Ajon päättäminen, vapauttaminen ja hyväksyminen

1. Kun ajo on valmis, napsauta Finish run (Päätä ajo) -painiketta.

Huomautus: koe tallentuu sisäiseen tietokantaan vasta kun tämä vaihe on valmis.

Huomautus: kerätyt tiedot analysoidaan automaattisesti määritysprofiliia vastaavan lisäosan mukaisesti sekä määritysprofiilissa määritettyjen sääntöjen ja parametrien mukaan.

2. Vapauta ja hyväksy ajo.

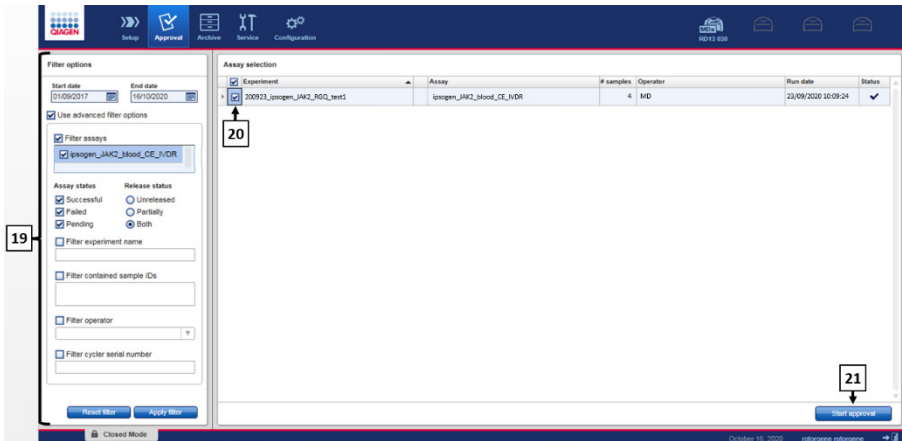
○ Jos olet kirjautunut sisään Approver (Hyväksyjä) -roolissa, valitse **Release and go to approval** (Vapauta ja siirry hyväksyntään).

○ Operator (Operaattori) -roolilla kirjautuneiden käyttäjien on valittava **Release** (Vapauta) -vaihtoehto.

Huomautus: Approval (Hyväksyntä) -ympäristön yleinen toiminnallisuus on kuvattu Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in -lisäosan käyttöoppaassa.

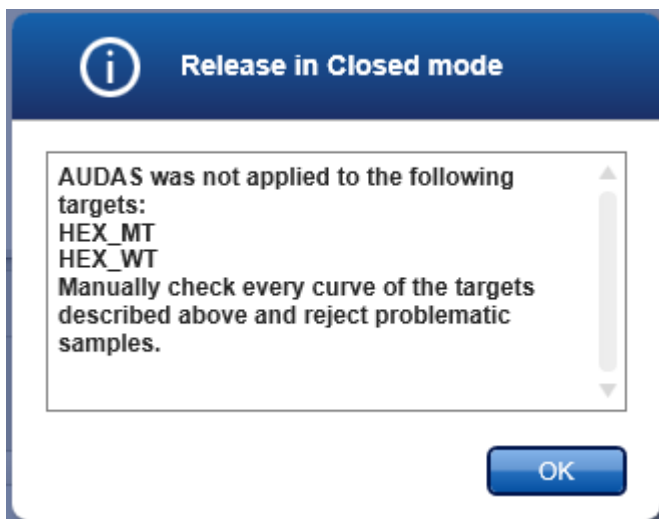
3. Vapauta tulokset.

- **Release and go to approval** (Vapauta ja siirry hyväksyntään) -vaihtoehdon valinta tuo kokeen tulokset näkyviin Approval (Hyväksyntä) -ympäristössä.
- Jos **Release** (Vapauta) -vaihtoehtoa napsautetaan, Approver (Hyväksyjä) -roolissa olevan käyttäjän on kirjauduttava sisään ja valittava Approval (Hyväksyntä) -ympäristö.
 - Ota suodatinvaihtoehdot käyttöön (kuva 15, laatikko 19) valitaksesi hyväksyttävän kokeen (kuva 15, laatikko 20). Valitse sitten **Apply** (Käytä) (kuva 15, laatikko 21).



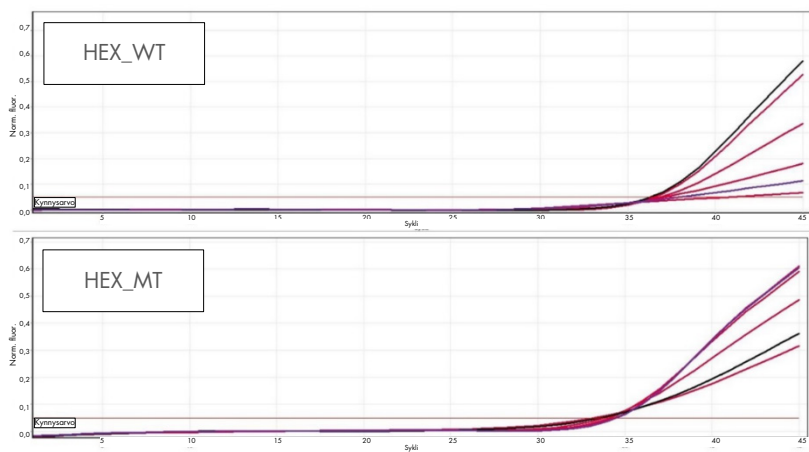
Kuva 15. Ajon hyväksyntä – kokeen valinta. 19: Suodatinvalinnat. 20: Määrittelyn valinta. 21: Hyväksynnän aloituspainike.

- Seuraava AUDAS (Automatic Data Scan) -varoitusta tulee näkyviin (kuva 16). Tarkista kohdassa Plots and information (Kaaviot ja tiedot) HEX-kohteiden fluoresenssikäyrät poikkeuksien varalta (esim. laitteiston virheiden aiheuttamat piikit).



Kuva 16. AUDAS-varoitus.

Huomautus: Huomaa, että sisäisen kontrollin HEX-kohteiden käyrien sigman muoto poikkeaa tavallisesta (kuten oheisissa esimerkikäyriissä kuvassa 17), ja ne on katsottava valideiksi käyriksi. Huomaa, että ohjelmisto tarkistaa automaattisesti kaikki muut sisäisen kontrollin validiuskriteerit (esim. C_T -rajat).



Kuva 17. Sisäisen kontrollin HEX-käyrät.

Approver (Hyväksyjä) -roolilla varustetun käyttäjän on hyväksyttävä ja vapautettava Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston automaattisesti analysoimat testitulokset. Alun perin kaikkien päättyneiden kokeiden testinäytteiden tila on Undefined (Määrittämätön). Hyväksyttävissä näytetuloksissa on kolme hyväksyntäpainiketta vastaavan rivin perässä. Näillä painikkeilla voidaan hyväksyä tai hylätä näytetulokset (kuva 18 ja kuva 19).

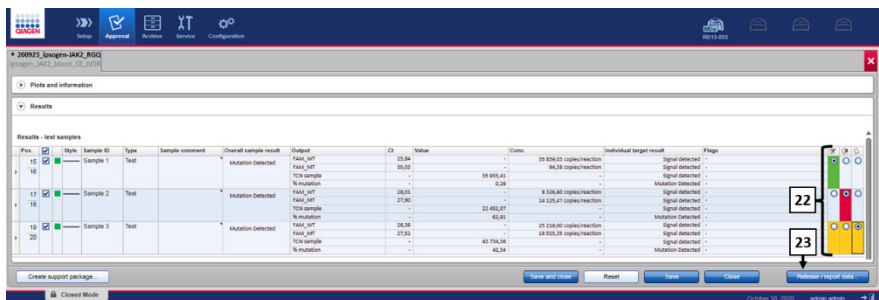
Huomautus: näytettä, jonka tilaksi Rotor-Gene AssayManager v2.1 on raportoinut INVALID (VIRHEELLINEN), ei voi määrittää uudelleen tilaan VALID (HYVÄKSYTTY), vaikka näytetulos hylättäisiin.

Huomautus: näyte pitää hylätä, jos käyttäjä ei hyväksy tulosta ja haluaa uusia testin (esim. jos sisäisen kontrollin HEX-kohteen käyrässä esiintyy jotain poikkeavaa).

- Tarkista tulos (kuva 19, laatikko 22) ja valitse **Release/Report data** (Vapauta/raportoi tiedot) (kuva 19, laatikko 23).

Taustan väri	Testinäytteen tila
	Määrittämätön
	Hyväksytty
	Hylätty

Kuva 18. Näytteen hyväksynnän tilan määrittäminen.



Kuva 19. Vapauta ja raportoi tiedot. 22: Näytteen hyväksyntäpainikkeet (kunkin näytteen tulosten hyväksyntään [✓] tai hylkäämiseen [✗]). 23: Vapauta ja raportoi tiedot -painike.

- Anna tarvittaessa salasana, valitse **Create report** (Luo raportti) -valintaruutu ja valitse **OK** (kuva 20, laatikot 24 ja 25). Järjestelmä luo raportin .pdf-muodossa ja tallentaa sen automaattisesti ennalta määritettyyn kansioon.

Oletuskansio polku on:

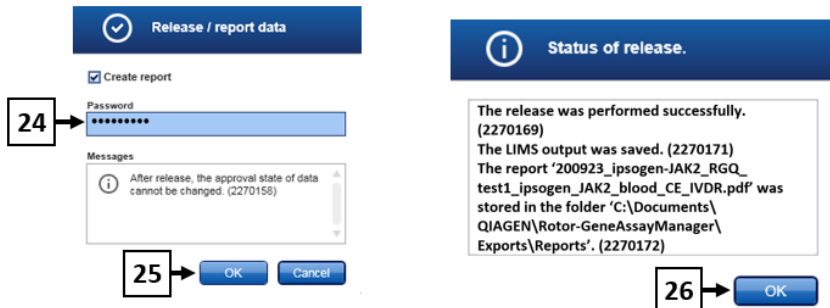
C: > Users (Käyttäjät) > Public (Yleinen) > Documents (Tiedostot) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Vie) > Reports (Raportit)

Huomautus: Tätä polkua ja kansiota voi muuttaa Configuration (Konfigurointi) -ympäristössä.

- Samalla LIMS-tiedosto luodaan automaattisesti ja tallennetaan ennalta määritettyyn kansioon. Oletuskansio polku on: **C: > Users (Käyttäjät) > Public (Yleinen) > Documents (Tiedostot) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Vie) > LIMS.**

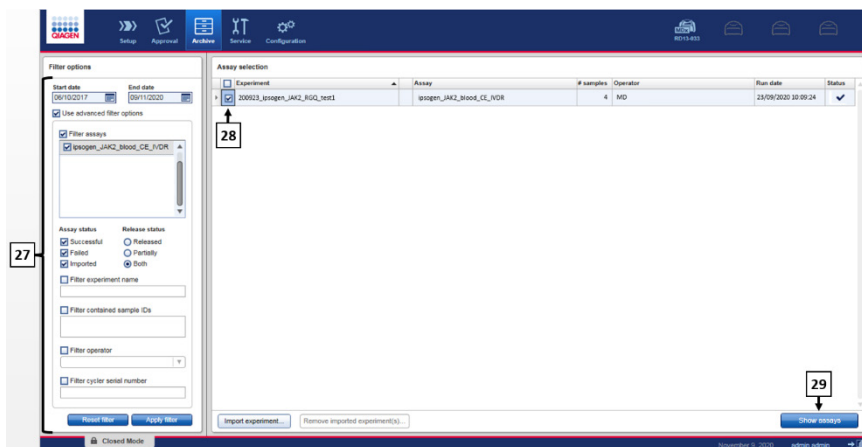
Huomautus: Tätä polkua ja kansiota voi muuttaa Configuration (Konfigurointi) -ympäristössä.

- Sulje pdf-tiedosto ja palaa Rotor-Gene AssayManager -ohjelmistoon. Valitse **OK** kehotuksen yhteydessä (kuva 20, laatikko 26).



Kuva 20. Vapauta ja raportoi tiedot. 24: Käyttäjän salasana. 25–26: Valittava OK-painike.

- Kun käyttäjän salasana annetaan, PDF-raportti luodaan ja se avautuu. Sulje PDF-raportti. LIMS-tiedosto luodaan automaattisesti ja näkyviin tulee vapautusilmoitus. Valitse **OK**. Määritys on nyt vapautettu. Siirry arkistointiympäristöön napsauttamalla **OK**-painiketta.
- Siirry Archive (Arkisto) -välilehteen viemään käsittelemättömät tiedot sisältävä .rex-tiedosto. Etsi kokeesi suodatinvalintojen avulla (kuva 21, laatikot 27 ja 28) ja valitse Show assays (Näytä määritykset) (kuva 21, laatikko 29).



Kuva 21. Arkistointiympäristö. 27: Suodatinvalinnat. 28: Määrittelyn valinta. 29: Määrittysten näyttöpainike.

- Kokeen tulokset tulevat näkyviin. Valitse näytön oikeassa alakulmassa vietävän tiedoston tyypiksi **.rex-tiedosto**. Napsauta **Export (Vie)** -painiketta. Tallenna valitsemalla **OK**. Ohjelmisto tallentaa **.rex-tiedoston** automaattisesti seuraavaan ennalta määritettyyn kansioon: **C: > Users (Käyttäjät) > Public (Yleinen) > Documents (Tiedostot) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Vie) > Experiments (Kokeet)**.

Huomautus: Tämän polun ja kansion voi muuttaa välilehdessä Specify the .rex file export destination (Määritä .rex-tiedoston vientikansio).

Huomautus: Vianmäärittystä varten tarvitaan ajosta luotu tukipaketti. Tukipaketteja voidaan tuottaa hyväksyntä- tai arkistoympäristössä (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöopas, Vianmäärittys-osa, Tukipaketin luominen). Lisäksi auditointiloki tapahtumahetkeltä ±1 päivä voi olla hyödyllinen. Auditointilokin voi hakea Service (Huolto) -ympäristöstä (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöopas, osa 1.5.5.5).

4. Poista Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ladatut materiaalit ja hävitä liuskaputket paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.

Tulosten tulkinta

Analyysi tapahtuu täysin automaattisesti.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto analysoi ensin* monistuskäyriä ja voi merkitä epäyhteensopivat käyrät virheellisiksi niiden muodon ja kohina-amplitudin mukaan. Tällaiset käyrät on merkitty erityisellä merkinnällä.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analysoi sitten ajon kontrollit:

- NTC: NTC:stä tarkistetaan spesifisen monistuksen (JAK2 WT ja JAK2 MT) puuttuminen.
- WT ja MT QS: Kvantitointistandardien validointi perustuu kummankin standardikäyrän R²- ja kulmakerroin-arvoihin.
- WTC: JAK2-kopioiden kokonaismäärän (TCN) täytyy olla tarpeeksi suuri, jotta tämä kontrolli voidaan tulkita. Jos näin on, ohjelmisto laskee JAK2-mutaatioprosentin. Tämä ajon kontrolli validoidaan, jos sen tila testin mukaan on WT.
- MTC: JAK2-kopioiden kokonaismäärän täytyy olla tarpeeksi suuri, jotta tämä kontrolli voidaan tulkita. Jos näin on, ohjelmisto laskee JAK2-mutaatioprosentin. Tämä ajon kontrolli validoidaan, jos sen tilassa näkyy voimakkaasti positiivinen JAK2-mutaatio.

Sisäisen kontrollin (Internal Control, IC) on monistettava kaikissa kontrolleja ja kvantitointistandardeja sisältävissä kuopissa, ja monistumisen on oltava ennalta määritettyjen kontrollirajojen puitteissa.

Huomautus: Kunkin ajon päätteeksi luodussa raportissa näkyvät ajon kontrolleista saadut tulokset. Kaikkien ohjelman virheellisiksi määrittämien tietojen kohdalla on erityinen merkintä (taulukko 6).

* Käytössä vain FAM-kohteille.

Jos jokin näistä ajon kontroleista ei mukaudu rajoihin, se merkitään merkinnällä ASSAY_INVALID (VIRHEELLINEN MÄÄRITYS). Jos tämä merkki on korostettu, koko ajoa on pidettävä virheellisenä ja koe on toistettava.

Jos kaikki ajon kontrollit noudattavat määrittämiä, Rotor-Gene AssayManager v2.1 analysoi testinäytteet.

- Sisäisen kontrollin (Internal Control, IC) on monistuttava kaikissa näytteitä sisältävissä kuopissa, ja monistumisen on oltava ennalta määritettyjen rajojen puitteissa.
- Yhteensä tietyn näytteen kopiomäärän on oltava tarpeeksi suuri, että tulokset voidaan tulkita.
- JAK2-mutaatioprosentti lasketaan sen jälkeen ja tulos tulee näkyviin. CT-arvo on havaittava kussakin putkessa (WT ja MT), jotta Rotor-Gene AssayManager v2.1 validoi näytteen ja vastaava tulos on validi.

Huomautus: jos sekä ajon kontrollit että näytteen tulokset ovat valideja, raportissa näkyy kopioiden määrä ja mutaatioprosentti kussakin näytteessä.

- Taulukko 6 esittelee virheellisen näytteen merkinnät, jotka voidaan määrittää yksittäiselle putkelle Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston analyysissä, sekä selitykset kunkin merkinnän tarkoituksesta.
- Taulukko 7 (sivu 64) esittelee näytteen varoitusmerkinnät ja kuvaa termit.

Taulukko 6. Virheelliseksi määritetyn näytteen merkinnät ja niiden selitykset

Merkintä	Kuvaus
ANALYSIS_FAILED	Määrittys on määritetty virheelliseksi, koska analyysi epäonnistui. Ota yhteys QIAGENin tekniseen palveluun.
ASSAY_INVALID	Määrittys on virheellinen, sillä vähintään yksi ulkoinen kontrolli on virheellinen.
CONSECUTIVE_FAULT	Kohteen laskennassa käytetty kohde on virheellinen.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Käsittelemättömien tietojen monistuskäyrän muoto on tälle määrittämiselle epätavallinen. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri.
FLAT_BUMP	Käsittelemättömien tietojen monistuskäyrän muoto on tälle määrittämiselle epätavallinen (laakea kohouma). Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri (esimerkiksi virheellinen C _T -arvon määrittäminen).
INVALID_CALCULATION	Kohteen laskenta epäonnistui.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	Havaittu C _T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin mutanttikontrolli ja villityypin reaktioseos.
MC_IC_LOW_CT (WT)	Havaittu C _T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin mutanttikontrolli ja villityypin reaktioseos.
MC_IC_NO_CT (MT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin mutanttikontrolli ja mutanttireaktioseos.
MC_IC_NO_CT (WT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin mutanttikontrolli ja villityypin reaktioseos.
MC_LOW_CN	Mutanttikontrollin kopiomäärä on liian pieni.
MC_LOW_PERCENTAGE	Mutanttikontrollin mutaatioprosentti on liian pieni.
MC_NO_CN	Ei kopiomäärää mutanttikontrollille.
MC_NO_CT (MT)	Mutanttikontrollille ei havaittu C _T -arvoa mutanttireaktioseoksessa.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Taulukko 6. Virheelliseksi määritetyn näytteen merkinnät ja niiden selitykset (jatkuu)

Merkintä	Kuvaus
MC_NO_VALUE	Mutanttikontrollin mutaatioprosentilla ei ole arvoa.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi mutanttikontrollille mutanttireaktioosessa.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi mutanttikontrollille villityypin reaktioosessa.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Monistuskäyrä ylittää kynnysarvon useammin kuin kerran. Yksiselitteistä C_T -arvoa ei voida määrittää.
NO_BASELINE	Lähtötasoa ei löydy. Jatkoanalyysiä ei voi tehdä.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja mutanttireaktioos.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja villityypin reaktioos.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Ei havaittavaa C_T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja mutanttireaktioos.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Ei havaittavaa C_T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja villityypin reaktioos.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja mutanttireaktioos.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja villityypin reaktioos.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	C_T on havaittu mallittomassa kontrollissa.
OTHER_TARGET_INVALID	Saman näytteen toinen kohde on virheellinen.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	Tämän näytteen laskettu pitoisuus ylittää teknisen rajan.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Taulukko 6. Virheelliseksi määritetyn näytteen merkinnät ja niiden selitykset (jatkuu)

Merkintä	Kuvaus
QS_HIGH_SLOPE (MT)	Mutanttikulumakertoimen yläraja on ylittynyt.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	Villityyppikulmakertoimen yläraja on ylittynyt.
QS_IC_NO_CT (MT)	Ei havaittavaa C_T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin yksi tai useampi mutanttikvantifiointistandardi.
QS_IC_NO_CT (WT)	Ei havaittavaa C_T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin yksi tai useampi villityypin kvantifiointistandardi.
QS_LOW_SLOPE (MT)	Mutanttikulumakertoimen alaraja ei täyty.
QS_LOW_SLOPE (WT)	Villityyppikulmakertoimen alaraja ei täyty.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	Mutantti- R^2 :n alaraja ei täyty.
QS_LOW_RSQUARED (WT)	Villityyppi- R^2 :n alaraja ei täyty.
QS_NO_CT (MT)	Ei havaittavaa C_T -arvoa yhdelle tai useammalle mutanttikvantifiointistandardille.
QS_NO_CT (WT)	Ei havaittavaa C_T -arvoa yhdelle tai useammalle villityypin kvantifiointistandardille.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi yhdelle tai usealle mutantin kvantifiointistandardille.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi yhdelle tai usealle villityypin kvantifiointistandardille.
RUN_FAILED	Määritys määritettiin virheelliseksi, koska PCR-laitteessa tai sen liitännässä ilmeni ongelma.
RUN_STOPPED	Määritys määritettiin virheelliseksi, koska ajo lopetettiin manuaalisesti.
SAMPLE_LOW_CN	Testinäytteen kokonaiskopiomäärä on liian pieni.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	Havaittu C_T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja mutanttireaktioseos.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Taulukko 6. Virheelliseksi määritetyn näytteen merkinnät ja niiden selitykset (jatkuu)

Merkintä	Kuvaus
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja mutanttireaktioseos.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Ei havaittavaa C_T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja mutanttireaktioseos.
SAMPLE_NO_CN	Testinäytteelle ei ole kopiomäärää.
SAMPLE_NO_VALUE	Testinäytteen mutaatioprosentilla ei ole arvoa.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi testinäytteelle mutanttireaktioseoksessa.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi testinäytteelle villityypin reaktioseoksessa.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	Havaittu C_T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja villityypireaktioseos.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja villityypireaktioseos.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Ei havaittavaa C_T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja villityypireaktioseos.
SATURATION	Fluoresenssin raakadata saturoituu voimakkaasti ennen monistuskäyrän käännepistettä.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Monistuskäyrässä havaittiin piikki lähellä C_T -arvoa.
STEEP_BASELINE	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa jyrkästi nouseva perustaso.
STRONG_BASELINE_DIP	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa jyrkästi laskeva perustaso.
STRONG_NOISE	Monistuskäyrän kasvuvaiheen ulkopuolella havaittiin voimakasta kohinaa.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Taulukko 6. Virheelliseksi määritetyn näytteen merkinnät ja niiden selitykset (jatkuu)

Merkintä	Kuvaus
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Monistuskäyrän kasvuvaiheessa (eksponentiaalisessa vaiheessa) havaittiin voimakasta kohinaa.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakatassa aaltoileva perustaso.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	Villityypikontrollin mutaatioprosentti on liian suuri.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin villityypin kontrolli ja mutanttireaktioeos.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin villityypin kontrolli ja mutanttireaktioeos.
WTC_IC_NO_CT (MT)	Ei havaittavaa C_T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin villityypin kontrolli ja mutanttireaktioeos.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Ei havaittavaa C_T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin villityypin kontrolli ja villityypin reaktioeos.
WTC_NO_CN	Ei kopiomäärää villityypin kontrollille.
WTC_NO_VALUE	Villityypin kontrollin mutaatioprosentilla ei ole arvoa.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi villityypin kontrollille mutanttireaktioeosessa.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Havaittu C_T -arvo on odotettua matalampi villityypin kontrollille villityypin reaktioeosessa.

Taulukko 7. Näytteen varoitusmerkinnät ja termien kuvaus

Merkintä	Kuvaus
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Tämän näytteen fluoresenssin prosentuaalinen muutos suhteessa putkeen, jossa tapahtui suurin fluoresenssin muutos, on pienempi kuin määritetty alaraja.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Tämän näytteen reaktiotehokkuus ei ole ylittänyt määritettyyn raja-arvoon.
SPIKE	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakatassa piikki, mutta se on C_T -määrittämisalueen ulkopuolella.

Rajoitukset

Tämä sarja on tarkoitettu ammattikäyttöön.

Tuotetta saavat käyttää vain asianmukaisesti opastetut, molekyylibiologian tekniikoihin koulutetut ja laitteen tekniikan tuntevat asiantuntijat. Laitteen toimenpide on tehtävä molekyylibiologisessa laboratorioympäristössä.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit ei ole automaattinen laite, vaikka sillä tehtävän analyysin apuna käytetään erillistä mutaatioiden automaattiseen kvantifointiin tarkoitettua ohjelmistoa.

Tätä sarjaa on käytettävä tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaisesti yhdessä validoidun, kohdassa Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen sivulla 19 esitetyn laitteen kanssa.

Ota huomioon pakkauksen ja putkien etiketeissä ilmoitettut vanhenemispäivämäärät. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

Kaikki *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Mikäli tätä ohjetta ei noudateta, sillä saattaa olla vaikutusta suorituskykyyn.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on validoitu vain ihmisen 2K-EDTA:lla antikoaguloitun perifeerisen kokoveren analysointiin potilailta, joilla on diagnosoitu tai epäilty MPN.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on validoitu vain QIA Symphony DSP DNA Mini Kit -sarjan (tuotenumero 937236) tai QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjan (tuotenumero 61104) kanssa käytettäväksi.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on validoitu vain Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella (PCR) ja QIA Symphony SP -laitteella (näytteen valmistelu) käytettäväksi.

Tämän tuotteen off label -käyttö ja/tai osien muokkaaminen mitätöi QIAGENin vastuun.

Saatu diagnostinen tulos on tulkittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai patologisten löydösten kanssa. Vaikka henkilöillä ei ole JAK2 V617F/G1849T -mutaatiota, hänellä saattaa silti olla muita JAK2-mutaatioita. Testistä saattaa tulla virheellisesti negatiivisia tuloksia, jos nukleotideissa 88504–88622 on muita mutaatioita (16).

Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suorituskyky kaikissa niissä laboratoriossa käytetyissä menetelmissä, joita QIAGENin tekemät suorituskykytutkimukset eivät kata.

Suorituskykyominaisuudet

Analyytinen suorituskyky

Tyhjän raja

Tyhjän raja (Limit of Blank, LOB) määritettiin CLSI/NCCLS EP17-A2 -standardin mukaisesti 30 terveeltä luovuttajalta otetuista kokoverinäytteistä, joiden JAK2-tila oli villityyppinen (wild-type, WT), määrittelyssä käytettiin kolmea reagenssierää (120 mittausta/erä).

LOB-tulosten yhteenveto on taulukossa 8. Tämä vastaa normaalin populaation odotettua arvoa käytettäessä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa.

Taulukko 8. LOB-tulosten yhteenveto

	Mitattu LOB	Tyhjän lopullinen raja
Erä 1	0 %	
Erä 2	0 %	0 %
Erä 3	0 %	

Havaitsemisraja

Havaitsemisraja (Limit of detection, LOD, tai analyytinen herkkyys) määritettiin Probit approach -menetelmällä, joka on kuvattu standardissa CLSI/NCCLS EP17-A2. Tässä tutkimuksessa analysoitiin kuusi heikon tason mutaatiota kolmesta erillisestä näytteestä (MPN-kokoveri-DNA lisättynä villityypin [wild-type, WT] kokoveri-DNA:han) kolmella erällä, 60 mittauksella per näyte ja per mutaatio. Saadut tulokset osoittivat analyttisen herkkyyden olevan 0,042 % JAK2 V617F -mutaation osalta.

LOD-tulosten yhteenveto on taulukossa 9.

Taulukko 9. LOD-tulosten yhteenveto

	Mitattu LOD	Lopullinen havaitsemisraja
Erä 1	0,041 %	
Erä 2	0,029 %	0,042 %
Erä 3	0,042 %	

Kvantifiointiraja

Kvantifiointirajan (Limit of Quantitation, LOQ) määrittely ja määrittäminen perustuu CLSI/NCCLS EP17-A2 -ohjeeseen. LoQ määritettiin matalimmaksi JAK2 V617F -mutaatioprosenttitasoksi, joka voidaan tarkasti erottaa *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan LoD:n rajoissa niin, että luottamusväli on 95 % (virheriski $\alpha = 0,05$). Tietoja yhden tutkimuslaitoksen toistettavuustutkimuksessa käytettiin *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan LoQ:n laskennassa. Saadut tulokset osoittivat LoQ:n olevan 0,233 % JAK2 V617F -mutaation osalta.

Molekulaarisen sairauden seurannan kontekstissa tämä tarkoittaa, että jos mitattu JAK2 V617F -mutaatioprosentti on alle 0,233 % tietyssä aikana, JAK2 V617F -alleelikuorman vähenemistä ei voida luotettavasti kvantifioida seuraavassa aikapisteessä.

Lineaarisuus

MPN-potilaiden JAK2-mutaation kvantifioinnin lineaarisuus arvioitiin CLSI/NCCLS EP06AE -standardin mukaisesti yhdellä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan erällä ja testaamalla 11 mutaatiotasoa viidestä eri DNA-syötteestä. JAK2-mutaatiotaakan kvantifiointi MPN-näytteistä on lineaarista; ts. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit kykenee kvantifioimaan näytteet LOD-arvosta 100-prosenttiseen mutaatioon, joka vastaa kohdepopulaation odotusarvoja, kunhan kvantifioidun DNA-näytteen pitoisuus on lähellä pitoisuutta 10 ng/μl (välillä 5–20 ng/μl).

Toistettavuus ja uusittavuus

Yhdessä tutkimuslaitoksessa tehdyn tarkkuustutkimuksen malli täyttää CLSI/NCCLS EP5-A3 -standardin vaatimukset. Testaus tehtiin 11 mutaatiotasolla, välillä 0,07–72,67 %, käyttämällä MPN-potilaalta otetulle kliiniselle näytteelle tehtyä laimennussarjaa. Kolme käyttäjää teki 108 mittausta jokaiselle mutaatiotasolle 27 päivän aikana (kaksi replikaattia joka ajossa ja kaksi ajoa päivässä) käyttämällä kolmea *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan erää ja kolmea Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitetta. 100 %:n tason tarkkuus osoitetaan vertaamalla sitä 72,67 %:n tasolle määritettyyn tarkkuuteen perustuen trendianalyysiin, joita tukevat MUTZ-8-solulinjan DNA:sta koostuvasta 100 %:n JAK2 V617F -näytteestä saadut lisätiedot (38 mittausta).

Tulosten yhteenveto on taulukossa 10.

Taulukko 10. Tarkkuustulokset: toistettavuus (yhden tutkimuslaitoksen tutkimus)

Näyte	Keskimääräinen JAK2-mutaatioprosentti	SD _{R+}	SD _{RUN++}	SD _{YHT+++}	CV _{YHT}
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: keskihajonta

R+: toistettavuus

RUN++: ajojen välinen tarkkuus

YHT+++ : kokonaistarkkuus (mukaan lukien laitteiden, käyttäjien ja erien välinen tarkkuus)

CVYHT: kokonaistarkkuuden variaatiokerroin prosentteina

ND: ei määritetty

Laboratorion välisen tarkkuustutkimuksen malli täyttää CLSI/NCCLS EP5-A3 -standardin vaatimukset. Tutkimukseen osallistui neljä tutkimuslaitosta (Ranskassa, Saksassa ja kaksi laitosta Yhdysvalloissa). Testaus tehtiin seitsemällä mutaatiotasolla, välillä 1,21–67,64 %, käyttäen laimennoksia terveiltä luovuttajilta saaduista MUTZ-8-solulinjan kokoverinäytteistä (eli keinotekoisia näytteitä). Jokaisessa laitoksessa tehtiin kolme DNA:n eristystä käyttämällä QIASymphony SP -laitetta ja yksilöllistä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan erää. Jokainen DNA:n eristys testattiin kahdeksassa qPCR-ajossa (kaksi ajoa päivää ja laitosta kohti neljänä ei-peräkkäisenä päivänä) käyttämällä yksilöllistä ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa, jolloin saatiin 96 odotettua mittausta näytettä kohti kaikissa laitoksissa.

L2-näyte hylättiin yhdessä eristysajossa, jolloin qPCR-testejä oli yhteensä 88, ei 96. Lisäksi yksi qPCR-ajo oli virheellinen, josta seurasi kolme virheellistä testiä kaikille näytteille (poikkeuksena L2, eli 2 virheellistä tulosta). Lisäksi L7- näyte oli virheellinen yhdessä qPCR-ajossa ja L4 oli virheellinen kahdessa qPCR-ajossa, jolloin tuloksena oli 2 virheellistä testiä lisää (taulukko 11).

100 %:n tason tarkkuus osoitetaan vertaamalla sitä 67,64%:n tasolle määritettyyn tarkkuuteen perustuen trendianalyysiin, joita tukevat MUTZ-8-solulinjan DNA:sta koostuvasta 100 %:n JAK2 V617F -näytteestä saadut lisätiedot (38 mittausta).

Taulukko 11. Tarkkuustulokset: uusittavuus (laboratorioiden välinen tutkimus)

Näyte	Testejä yhteensä	Virheellisiä testejä yhteensä	JAK2%MT-keskiarvo	Ajon sisäinen, SD, %CV	Ajojen välinen päivässä, SD, %CV	Päivien välinen, SD, %CV	Laitosten välinen, SD, %CV	Yhteensä, SD, %CV
L0	–	–	100	–	–	–	–	≤ 4,074, ≤ 6,02
L1	96	3	67,64	2,616; 3,87	2,060; 3,05	1,999; 2,96	1,530; 2,26	4,074; 6,02
L2	88	2	40,03	3,482; 8,70	1,011; 2,53	2,389; 5,97	0,986; 2,46	4,387; 10,96
L3	96	3	22,26	3,318; 14,90	1,256; 5,64	1,257; 5,64	0,803; 3,61	3,807; 17,10
L4	96	5	8,02	1,770; 22,06	0,516; 6,44	0,000; 0,00	0,000; 0,00	1,841; 22,95
L5	96	3	4,35	0,706; 6,23	0,547; 12,57	0,000; 0,00	0,197; 4,53	0,906; 20,82
L6	96	3	2,03	0,246; 12,15	0,365; 18,00	0,063; 3,11	0,000; 0,00	0,441; 21,76
L7	96	4	1,21	0,104; 8,62	0,057; 4,72	0,211; 17,43	0,000; 0,00	0,189; 15,64

JAK2%MT: JAK2-mutaatioprosentti; **SD:** keskihajonta; **CV:** variaatiokerroin prosentteina; –: ei olennainen

Lisäksi tehtiin laboratorioiden välinen tutkimus kolmessa tutkimuslaitoksessa (yksi Euroopassa ja kaksi Yhdysvalloissa). Tutkimuksessa käytettiin neljää MPN-potilailta otettua kokoverinäytettä (eli kliinisiä näytteitä). Jokaisessa tutkimuslaitoksessa tehtiin kolme DNA:n eristämisajoa. Jokainen DNA:n eristys testattiin 12 qPCR-ajossa (yksi replikaatti kohti ajoa ja kohti näytettä, kaksi ajoa kohti päivää ja kohti käyttäjää jokaisessa laitoksessa – jokaisessa laitoksessa tutkimukseen osallistui kaksi käyttäjää kolmen ei-peräkkäisen päivän aikana) käyttämällä yhtä Rotor-Gene Q MDx -laitetta ja yhtä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan erää. Jokaisesta näytteestä saatiin 36 mittausta (taulukko 12).

Taulukko 12. Laboratorioiden välisen lisätutkimuksen tulokset

Näyte	N	JAK2%MT-keskiarvo	Ajon sisäinen, SD, %CV	Ajojen välinen päivässä, SD, %CV	Päivien välinen, SD, %CV	Laitosten välinen, SD, %CV	Yhteensä, SD, %CV
Näyte 1	36	95,19	0,995; 1,04	0,000; 0,00	0,541; 0,57	0,000; 0,00	1,130; 1,19
Näyte 2	36	22,83	3,988; 17,47	0,000; 0,00	1,707; 7,48	1,552; 6,80	4,501; 19,72
Näyte 3	36	14,44	2,257; 15,63	1,398; 9,68	0,000; 0,00	1,422; 9,84	2,890; 20,01
Näyte 4	36	4,03	0,186; 4,63	0,835; 20,74	0,000; 0,00	0,608; 15,09	0,922; 22,91

JAK2%MT: JAK2-mutaatioprosentti; **N:** mitausten määrä; **SD:** keskihajonta; **CV:** variaatiokerroin prosentteina

Häiritsevät aineet (analyttinen spesifisyys)

Tutkimusjärjestely täyttää NCCLS-standardin EP7-A3 vaatimukset häiritsevien aineiden testaamisesta kliinisessä kemiassa. Seuraavat 19 verinäytteissä mahdollisesti olevaa ainetta valittiin niiden PCR-vaikutuksen tutkimiseksi: busulfaani, sitalopraamihydrobromidi, paroksetiinihydrokloridihemihydraatti, sertraliinihydrokloridi, fluoksetiinihydrokloridi, asetaminofeeni (parasetamoli), konjugoitumaton bilirubiini, kalium-2K-EDTA ja -3K-EDTA, natrium-EDTA, hemoglobiini (ihmisen), triglyseridit, lisinopriilidehydraatti, hydroksiurea, asetyyლისალისylihapo, salisyylihapo, tiotepa, anagrelidi, alfa-2b-interferoni.

Myös DNA:n eristysprosessin aineita arvioitiin (QIAsymphony DSP DNA Blood Mini Kit -sarjan QSL1, QSB1, QSW1, QSW2 ja PK, QIAGEN-proteaasi, etanoli, QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjan AW1 ja AW2).

Saaduissa tuloksissa ei näkynyt häiritsevää vaikutusta näistä aineista.

Taulukko 13. Häiritsevät aineet

Testattu aine	Testattu pitoisuus
Konjugoitumaton bilirubiini	150,3 µg/ml
Hemoglobiini (ihmisen)	2 000 µg/ml
Triglyseridit	30 000 µg/ml
Busulfaani	38,4 µg/ml
Sitalopraamihydrobromidi	0,75 µg/ml
Paroksetiinihydrokloridihemihydraatti	1,14 µg/ml
Sertraliinihydrokloridi	0,67 µg/ml
Fluoksetiinihydrokloridi	3,87 µg/ml
Asetaminofeeni (parasetamoli)	200,7 µg/ml
Lisinopriilidehydraatti	0,33 µg/ml
Hydroksiurea	28,2 µg/ml
Asetyyლისისყილიჰაპო	651,6 µg/ml
Salisyylihappo	0,6 µg/ml
Tiotepa	48 µg/ml
Anagrelidi	6 µg/ml
Alfainterferoni 2b*	1,8 MU/l
Kalium-EDTA (2K-EDTA)	2X (3 600 µg/ml)
Kalium-EDTA (3K-EDTA) †	1X (1 800 µg/ml), 3X (5 400 µg/ml)

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Taulukko 13. Häiritsevät aineet (jatkuu)

Testattu aine	Testattu pitoisuus
Natrium-EDTA (2Na-EDTA) †	1X (3 000 µg/ml), 3X (9 000 µg/ml)
QSL1	2 % koko näytemäärästä
QSB1	2 % koko näytemäärästä
QSW1	2 % koko näytemäärästä
QSW2	2 % koko näytemäärästä
Proteinaasi K (PK)†	2 % koko näytemäärästä
Proteinaasi K (PK)†	2x odotettu jäännösmäärä eristysprosessin jälkeen 3x odotettu jäännösmäärä eristysprosessin jälkeen
QIAGEN-proteaaasi	1,29 E-05 % koko näytemäärästä
Etanoli (EtOH)	1,29 E-03 % koko näytemäärästä
Buffer AW1	1,00 E-01 % koko näytemäärästä
Buffer AW2	1,00 % koko näytemäärästä

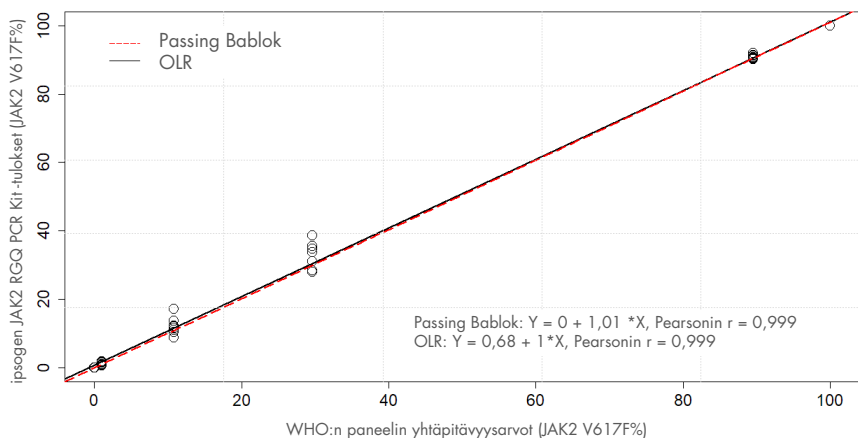
* Suositeltu annostus PV-potilaille on 3 MU, minkä oletetaan jakautuvan 5 litraan verta (henkilön paino 80 kg), jolloin pitoisuus on 0,6 MU/l. NCCLS-standardin EP7-A2 suositusten mukaan tämä pitoisuus testattiin kolminkertaisena, eli 1,8 MU/l.

† 1x-pitoisuus toimittajan mukaan

‡ PK aiheuttaa häiritsevän vaikutuksen, kun testataan 2 %:n pitoisuudella koko näytemäärästä (tapahtuu epätodennäköisesti). Lisätestit vahvistivat, että PK poistuu eristämisprosessissa: häiriöitä ei odoteta normaaleissa käyttöolosuhteissa.

WHO:n kansainvälisen genomisen JAK2 V617F -viitepaneelin testaaminen (NIBSC, paneelin koodi 16/120)

WHO:n 1. kansainvälinen viitepaneeli genomiselle JAK2 V617F:lle, jonka on kehittänyt National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, paneelin koodi 16/120), testattiin käyttämällä kolmea *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan erää (kolme replikaattia viitepaneelin tasoa kohti ja reagenssierää kohti). Kokeet teki yksi käyttäjä kolmena päivänä yhdellä Rotor-Gene Q 5plex HRM -laitteella. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan tulosten välinen yhtäpitävyys ja viitepaneelin käyttöohjeissa julkaistut yhtäpitävyysarvot arvioitiin käyttämällä tavallista lineaarista regressiota (kulmakerroin: 1,003, 95 %:n CI [0,997; 1,010] – leikkauspiste: 0,677, 95 %:n CI [0,212; 1,289]) ja Passing-Bablokin regressiota (kulmakerroin: 1,01, 95 %:n CI [1,00; 1,021] – leikkauspiste: 0,00, 95 %:n CI [-0,02; 0,010]) (kuva 22). Yhtäpitävyys on vahvistettu, ja se osoittaa sarjan soveltuvuuden JAK2 V617F -tietojen tuottamiseen ja näiden tietojen yhtenevyyden muiden yleisesti käytettyjen diagnostisten tekniikkojen kanssa.



Kuva 22. Yhtäpitävyys ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan tulosten ja WHO:n kansainvälisen genomisen JAK2 V617F:n viitepaneelin (NIBSC, paneelin koodi 16/120) yhtäpitävyysarvojen välillä. Yhtäpitävyyttä arvioitiin käyttämällä tavallista lineaarista regressiota (ordinary linear regression, OLR) ja Passing-Bablokin regressiota. Paneeli koostuu seitsemästä JAK2 V617F -tasosta: 100 %, 89,5 %, 29,6 %, 10,8 %, 1,00 %, 0,03 % ja 0 %. WHO:n yhtäpitävyysarvot määritettiin käyttämällä erilaisia yleisesti käytössä olevia tekniikoita osana kansainvälistä yhteistyötutkimusta. Kullekin JAK2 V617F -prosenttitasolle määritetyt viitearvot ovat mediaaniarvoja (lisätietoja osoitteesta <https://www.nibsc.org>).

Oikeellisuus ja tarkkuus

Mittauksen oikeellisuus on käänteisessä suhteessa systemaattiseen mittausvirheeseen (systematic error, SE, tai vinouma). Vinouma laskettiin NCCLS:n ohjeen EP09c ohjeiden mukaan kullekin viitepaneelin JAK2 V617F -prosenttitasolle, jokaisella reagenssierällä sekä kaikille reagenssierille (taulukko 14). Laskuissa käytettiin yllä kuvatussa tutkimuksessa saatuja tietoja. Suurimmat vinouma-arvot saatiin ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan erästä 2.

Tarkkuus on testituloksen ja hyväksytyyn viitearvon yhtäpitävyyden läheisyydestä kertova arvo (tässä tapauksessa kullekin WHO:n paneelin JAK2 V617F -prosenttitasolle määritetty arvo). Tarkkuus huomioi sekä oikeellisuuden että tarkkuuden, ja se on käänteisessä suhteessa kokonaisvirheeseen, joka on laskettu kuten taulukossa 14.

Taulukko 14. Vinouma ja mittausvirhe

WHO:n paneeli Ampullikoodi	<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit -erä	Vinouma (SE) erää kohti [95 %:n CI]	Kokonaisvinouma (SE) [95 %:n CI]	Kokonaisvirhe (tarkkuus)
15/172 0 %	1	0,000 [-]	0,001 [-0,001; 0,004]	0,010
	2	0,003 [-0,011; 0,018]		
	3	0,000 [-]		
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]		

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Taulukko 14. Vinouma ja mittausvirhe (jatkuu)

WHO:n paneeli Ampullin koodi	<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit -erä	Vinouma (SE) erää kohti [95 %-n CI]	Kokonaisvinouma (SE) [95 %-n CI]	Kokonaisvirhe (tarkkuus)
Viitearvo				
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 [-]		
	3	-0,013 [-0,028; 0,001]		

SE: Systemaattinen virhe tai vinouma, eli yksittäisen *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan mittauksen ($\bar{V}_{\text{JAK2 Kit}}$) ja WHO:n viitepaneelin yhtäpitävyyssarvon (V_{Ref}) välinen keskimääräinen ero.

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

Kokonaisvirhe (Total Error, TE) on laskettu arvona $TE = \sqrt{s^2 + SE^2}$, jossa s on keskihajonta (satunnainen virhe).

95 %-n CI: 95 %-n luottamusväli

-: ei olennainen

Analyytinen tarkkuus

Tämän tutkimuksen tarkoitus on validoida *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan analyytinen tarkkuus normaalissa käytössä analysoitaessa kliinisiä näytteitä tutkimushenkilöiltä, joilla epäillään myeloproliferatiivisia neoplasmoja. Tämä tutkimus tehtiin gDNA-näytteille, jotka eristettiin yhteensä 473 näytteestä: 276 näytteestä, joissa epäiltiin PV:tä, 98 näytteestä, joissa epäiltiin ET:tä, ja 99 näytteestä, joissa epäiltiin PMF:ää. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan avulla potilasnäytteestä saatua JAK2 V617F -tilaa verrattiin JAK2-tilan määrittämiseen käytetyllä vertailumenetelmällä (eli erikseen validoidulla kaksisuuntaisella sekvensoinnilla [bi-directional sequencing, BDS]) saatuun JAK2 V617F -tilaan. Koska *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan LoD on 0,042 % JAK2 V617F -mutaatiolle, potilasnäytteen JAK2 V617F -tilaksi saadaan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla testattaessa positiivinen, jos se saavuttaa tai ylittää tämän rajan, ja negatiivinen, jos se alittaa tämän rajan. 473 näytteestä 22 näytettä oli JAK2-positiivisia, kun ne testattiin *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla, vaikka ne saivat negatiivisen tuloksen BDS-menetelmällä.

Yleinen yhtäpitävyys 95,35 % (451/473 tutkittavaa; 95 %:n CI: 93,04 %, 97,06 %). Positiivinen yhtäpitävyys oli 100 % (165/165 tutkittavaa; 95 %:n CI: 97,79 %, 100 %), jossa negatiivinen yhtäpitävyys oli 92,86 % (286/308 tutkittavaa; 95 %:n CI: 89,39 %, 95,47 %). Tulokset on esitetty taulukossa 15.

Taulukko 15. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan ja Sangerin kaksisuuntaisen sekvensoinnin yhtäpitävyys MPN-populaatioissa (yhdistetyt ET-, PMF- ja PV-populaatiot)

		Sangerin kaksisuuntainen sekvensointi		
		JAK2 V617F - positiivinen	JAK2 V617F - negatiivinen	Yhteensä
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	JAK2 V617F - positiivinen	165	22	187
	JAK2 V617F - negatiivinen	0	286	286
	Yhteensä	165	308	473

Analyttisen tarkkuuden arviointitutkimuksen tulokset MPN-kohorteissa

JAK2 V617F -mutaation suhteen saadut yhtäpitävyyden tulokset *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla ja Sangerin sekvensoinnilla (BDS) ET-, PMF- ja PV-tutkittavilla on annettu erikseen:

- ET: yleinen yhtäpitävyys 89,8 % (88/98 tutkittavaa; 95 %:n CI: 82,03–95,0 %), positiivinen yhtäpitävyys oli 100 % (43/43 tutkittavaa; 95 %:n CI: 91,78–100 %) ja negatiivinen yhtäpitävyys oli 81,82 % (45/55 tutkittavaa; 95 %:n CI: 69,1–90,92 %).
- PMF: yleinen yhtäpitävyys 93,94 % (93/99 tutkittavaa; 95 %:n CI: 87,27-97,74 %), positiivinen yhtäpitävyys oli 100 % (51/51 tutkittavaa; 95 %:n CI: 93,02–100 %) ja negatiivinen yhtäpitävyys oli 87,5% (42/48 tutkittavaa; 95 %:n CI: 74,75-95,27 %).
- PV: yleinen yhtäpitävyys 97,83 % (270/276 tutkittavaa; 95 %:n CI: 95,33-99,2 %), positiivinen yhtäpitävyys oli 100 % (71/71 tutkittavaa; 95 %:n CI: 94,94–100 %) ja negatiivinen yhtäpitävyys oli 97,07% (199/205 tutkittavaa; 95 %:n CI: 93,74-98,92 %).

Näytteissä, jotka tuottivat ristiriitaisia tuloksia, havaittiin BDS:n havaintokapasiteetin alittavia mutaatiotasoja (noin 10 %). Koska Sangerin sekvensointi ei ole yhtä herkkä kuin *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja, joka voi raportoida jopa 0,042 %:n JAK2 V617F -tasoja (eli LoD-arvo), suoritettiin uusi tutkimus validoidulla uuden sukupolven sekvensointitekniikalla (next-generation sequencing, NGS), jotta JAK2 V617F -alleeli voitiin havaita 15/22 ristiriitaisessa näytteessä (yhdeksän ET-ryhmässä, viisi PMF-ryhmässä ja yksi PV-ryhmässä) sekä satunnaisesti valitusta 22 JAK2 V617F -positiivisten ja -negatiivisen yhtäpitävien näytteiden ryhmästä. Potilasnäytteiden JAK2 V617F -tila määritettiin NGS-menetelmällä menetelmän analyttisen herkkyyden rajojen perusteella (JAK2 V617F -mutaatiolle 1–2 %). Näin ollen potilasnäytteen JAK2 V617F -tila oli positiivinen, jos JAK2 V617F -mutaatio havaittiin NGS-menetelmällä ja vastavuoroisesti JAK2 V617F -tila oli negatiivinen, jos JAK2 V617F -mutaatiota ei havaittu.

Kaikki 15 ristiriitaista näytettä saivat positiivisen tuloksen NGS-menetelmällä, mikä oli yhtäpitävä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan tuloksen kanssa. Kaikki yhtäpitävät näytteet saivat samat tulokset NGS-menetelmällä ja *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla ja BDS-menetelmällä. Muita 7:ää näytettä pidettiin ristiriitaisina, koska niistä ei ollut saatavilla NGS-tietoja.

Analyttinen tarkkuuden tutkimuksen yhteenveto

Kun ristiriitaiset tapaukset luokiteltiin uudelleen NGS-tulosten perusteella *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja osoitti 98,3 %:n tarkkuuden JAK2 V617F -alleelin havaitsemisessa kaikilta MPN-tutkittavilta, joiden JAK2 V617F -taso oli $\geq 0,042$ % (LoD-arvo).

Kliininen suorituskyky

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan kliininen suorituskyky PV:n diagnosoinnissa arvioitiin kansainvälisessä, prospektiivisessä, interventionaalisessa monikeskustutkimuksessa.

Tutkimuksen tarkoitus oli osoittaa *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan tarkkuus V617F-mutaation havaitsemisessa tutkittavilta, joilla epäiltiin olevan PV. JAK2-tilan vertailutavaksi määritettiin erikseen validoitu kaksisuuntainen sekvensointimenetelmä (BDS).

JAK2 V617F -mutaation havaitseminen on lisätty WHO:n laatimiin BCR-ABL-negatiivisen MPN:n diagnosoinnin vertailukriteereihin 2008 ja tämän mutaation havaitseminen on tärkeä kriteeri diagnoosin vahvistamiselle (17).

JAK2 V617F -mutaation löytyminen on yksi kahdesta diagnoosin pääkriteeristä (WHO 2008:n* mukaan PV-diagnoosi vahvistetaan, jos kaksi pääkriteeriä ja yksi sivukriteeri tai ensimmäinen pääkriteeri ja kaksi sivukriteeriä havaitaan [katso lisätietoja viitteestä 17]).

Tavoite oli arvioida diagnoosien spesifisyys, herkkyys, positiivinen ennustearvo (positive predictive value, PPV), negatiivinen ennustearvo (negative predictive value, NPV) ja todennäköisyysuhde WHO:n vuoden 2008 diagnostisten kriteerien* mukaisesti, kun JAK2 V617F -tilan määrittämiseen käytetään *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa, jonka positiivisuuden havaitsemisraja (sarjan LoD) on 0,042 %, tai BDS-menetelmää.

* Koska kliininen suorituskykytutkimus aloitettiin ennen WHO:n diagnostisten kriteerien päivitystä vuonna 2016, kliinisessä suorituskykytutkimuksessa käytettiin vuoden 2008 WHO:n diagnostisia kriteereitä.

Tutkimus tehtiin yhdeksässä tutkimuspaikassa Yhdysvalloissa (seitsemän tutkimukseen otettua tutkittavaa), 12 tutkimuspaikassa Ranskassa (kaikissa 12 tutkimukseen otettua tutkittavaa) ja yhdeksässä tutkimuspaikassa Italiassa (viisi tutkimukseen otettua tutkittavaa). Tutkittavat seulottiin ja valittiin PV:n diagnoosiin viittaavien sisäänottokriteerien mukaan. Kaikilta tutkimukseen otetuilta tutkittavilta otettiin verinäytteet, ja niille tehtiin *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla ja vertailutestillä, kaksisuuntainen sekvensointi (BDS), JAK2 V617F -mutaation ja JAK2:n eksonin 12 tilan määritykset. Tutkittavilta, joiden kliiniset ominaisuudet olivat yhteneviä PV-diagnoosin kanssa (esim. noussut hemoglobiinitaso ja pienentynyt erytropoietiinitaso [EPO]), mutta jotka BDS-menetelmä määritteli negatiivisiksi JAK2 V617F -mutaation ja eksonin 12 osalta, ja tutkittavilta, jotka BDS-menetelmä määritteli positiivisiksi JAK2 V617F -mutaation ja eksonin 12 osalta ja joilla oli normaali tai korkea EPO-taso, otettiin histologisesti ja sytogeneettisesti analysoitava luuydinbiopsia, kuten WHO:n vuoden 2008 diagnostinen algoritmi myeloproliferatiivisille sairauksille edellyttää. Lopullinen diagnoosi (PV tai ei-PV) määritettiin muiden kuin tutkimukseen kuuluvien toimenpiteiden tulosten avulla (WHO:n vuoden 2008 kriteerit JAK2-mutaation määrittämiseen käyttämällä vertailussa käytettyä BDS-määrittystä).

Yhteensä 216 tutkittavaa määritettiin arvioitavaan populaatioon, johon kuuluivat kaikki osallistujat, jotka täyttivät sekä kliiniset seulontakriteerit että analyysikriteerit vertailussa käytettävällä BDS-määrittelyllä arvioituna. Lisäksi 67 tutkittavaa jätettiin arvioinnin ulkopuolelle taulukossa 16 määritetyistä syistä (jotkin tutkittavat eivät olleet soveltuvia tutkimukseen useammasta kuin yhdestä syystä).

Taulukko 16. Tutkimuksesta poissulkemisen syyt tutkimukseen otetussa populaatiossa

Syy	Tutkimushenkilöiden määrä
Sisäänottokriteerin täyttymättömyys tai poissulkemiskriteeri	9
Puuttuvat EPO-tulokset	22
Puuttuva luuydinbiopsia, jos vaaditaan PV-diagnosiin	26
JAK2 V617F -positiivisuus BDS:llä määritettynä ja seerumin EPO normaaleissa rajoissa	15
JAK2:n eksoni 12 -positiivisuus BDS:llä määritettynä ja seerumin EPO normaaleissa rajoissa	1
JAK2 V617F -negatiivisuus BDS:llä määritettynä ja seerumin EPO poikkeuksellisen matala	10
Potilas ei suorittanut tutkimusta loppuun ja/tai PV:n lopullinen diagnoosi puuttuu	15

Tätä tutkimusta varten tehtiin yhteensä 221 JAK2 V617F -tilan arviointia (sisältäen viisi toistotestiä) *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla Rotor-Gene Q MDx -laitteessa (taulukko 17, taulukko 18).

Taulukko 17. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR -testitulosten yhteenveto (arvioitava populaatio)

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Yhteensä (N = 216)
JAK2 V617F -positiivinen (\geq LoD 0,042 %)	54
JAK2 V617F -negatiivinen ($<$ LoD 0,042 %)	162

Taulukko 18. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR -testitulosten yhteenveto – JAK2 V617F -positiivinen populaatio (arvioitavan populaation joukosta)

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Yhteensä (N = 54)
Saatu JAK2 %MT -keskiarvo	51,54
Saatu JAK2 %MT -vähimmäisarvo	0,14
Saatu JAK2 %MT -enimmäisarvo	93,43

N: näytteiden määrä; **JAK2 %MT:** JAK2-mutaatioprosentti

Validointitutkimuksen tuloksen arviointi: suorituskyvyn tulos

Lopullisten PV- ja ei-PV-diagnoosien vertailu osoitti, että kaksi diagnoosimenetelmää olivat yhteneviä: 94,6 %:lla tutkittavista (53/56 tutkittavaa), joilla tutkija diagnosoiti PV:n, diagnosoitiin PV myös *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa ja WHO:n diagnoosikriteerejä käyttämällä. Samoin 95,6 %:lla tutkittavista (153/160 tutkittavaa), jotka tutkija diagnosoiti PV-vapaiksi, diagnosoitiin PV-vapaiksi myös *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa ja WHO:n diagnoosikriteerejä käyttämällä (taulukko 19, taulukko 20).

JAK2 V617F -mutaation ja eksonin 12 tilat määritettynä BDS:llä ja JAK2 V617F -mutaation tilat määritettynä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla on esitetty yhteenvetona taulukossa 19. Vertailu kullakin testausmenetelmällä tehtyjen PV-diagnoosien ja PV-vapauden diagnoosien välillä on taulukossa 19.

Taulukko 19. Mutaation tila (JAK2 V617F kaksisuuntaisella sekvensoinnilla, JAK2:n eksoni 12 kaksisuuntaisella sekvensoinnilla ja *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla) järjestettynä PV-tilan mukaan (arvioitava populaatio)

Muuttuja	PV (N = 56)	Ei-PV (N = 160)	Yhteensä (N = 216)
JAK2 V617F -mutaation tila BDS-menetelmällä			
Positiivinen	48 (85,7 %)	1 (0,6 %)	49 (22,7 %)
Negatiivinen	8 (14,3 %)	159 (99,4 %)	167 (77,3 %)
JAK2:n eksonin 12 mutaation tila BDS-menetelmällä			
Positiivinen	3 (5,4 %)	0	3 (1,4 %)
Negatiivinen	53 (94,6 %)	160 (100,0 %)	213 (98,6 %)
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan tila			
Positiivinen	48 (85,7 %)	6 (3,8 %)	54 (25 %)
Negatiivinen	8 (14,3 %)	154 (96,3 %)	162 (75 %)

N: tutkijan diagnosoimien potilaiden määrä (arvioitu populaatio).

Jokaiselle mutaation tilalle ilmoitettu potilaiden määrä on ilmaistu absoluuttisena lukuna ja arvioitavan populaation prosenttilukuna (sulkeissa).

Taulukko 20. Lopullinen PV-diagnosi perustuen tutkijan kaksisuuntaisen testauksen ja vuoden 2008 Maailman terveysjärjestön (WHO) kriteerien pohjalta muodostamaan mielipiteeseen käyttämällä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa

Tutkijan lopullinen diagnoosi perustui WHO:n kriteereihin ja BDS:llä tehtyyn JAK2-arviointiin

Lopullinen diagnoosi perustuen WHO:n kriteereihin ja <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla tehtyyn JAK2-arviointiin	PV (N = 56)	Ei-PV (N = 160)	Yhteensä (N = 216)
PV	53 (94,6 %)	1 (0,6 %)	54 (25 %)
Ei-PV	1 (1,8 %)	153 (95,6 %)	154 (71,3 %)
Epäselvä	2 (3,6 %)	6 (3,8 %)	8 (3,7 %)

N: tutkijan diagnosoimien potilaiden määrä (arvioitu populaatio)

Määrät on ilmaistu absoluuttisena lukuna ja arvioitavan populaation prosenttilukuna (sulkeissa).

Epäselvät tapaukset

Kolmella tutkittavalla oli JAK2 V617F -villityppi (sekä BDS:n että *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan mukaan), minkä lisäksi heillä oli matalat seerumin EPO-pitoisuudet ja epäselvä luuydinhistologia (kahdelle tutkija diagnosoi PV:n ja yhden tutkija diagnosoi olevan PV-vapaa). BDS-menetelmän mukaan viidellä tutkittavalla oli JAK2 V617F -villityppi, *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja antoi heille positiivisen tuloksen, ja lisäksi heille ei tehty luuydinbiopsiatutkimusta (tutkija diagnosoi kaikkien viiden olevan PV-vapaita). Vaikka luuydinhistologiaa ei ollut tai se oli epäselvä, nämä kahdeksan tapausta otettiin mukaan spesifisyyden ja herkkyuden laskelmiin (taulukko 21) ristiriitaisina tapauksina.

Ristiriitaiset tapaukset

Kahdelle tutkittavalle tutkijan diagnoosi erosi diagnoosista, joka saatiin käyttämällä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa ja WHO:n diagnosointikriteerejä. Yhden tutkittavan seerumin EPO-tasot olivat normaalilla alueella (16,5 IU/l), eikä JAK2 V617F -mutaatiota tai eksonin 12 mutaatiota havaittu. Tutkijan mielipiteen mukaisesti tutkittavalle diagnosoitiin silti PV. Yhden tutkittavan seerumin EPO-tasot olivat normaalia matalammat ja hänellä oli BDS-menetelmällä havaittu JAK2 V617F -mutaatio, mutta tutkijan mielipiteen mukaisesti hänelle ei diagnosoitu PV:tä. Protokollan mukaisesti tutkijan diagnoosin olisi pitänyt noudattaa tiukasti WHO:n diagnostisia kriteerejä vuodelta 2008. Kuitenkin näissä kahdessa ristiriitaisessa tapauksessa tutkija käytti algoritmin tulkitsemisessa kliinistä harkintaa.

Kuten taulukon 21 yhteenvedossa esitetään, kaiken kaikkiaan PV-diagnoosin herkkyys *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa käytettäessä oli 94,64 % (53/56 tutkittavaa; 95 %:n CI: 85,13 %, 98,88 %), mikä osoitti, että tämän määrittelyn oletetaan havaitsevan PV suurimmalla osalla tutkittavista, joilla tämä sairaus on. Samoin PV-diagnoosin spesifisyys tällä määrittelyllä tutkittuna oli 95,62 % (153/160 tutkittavaa; 95 %:n CI: 91,19 %, 98,22 %), mikä osoitti, että tämän määrittelyn oletetaan myös sulkevan PV:n mahdollisuuden pois suurimmalla osalla tutkittavista, joilla tätä sairautta ei ole.

Lisäksi positiivinen ennustearvo (Positive Predictive Value, PPV) ja negatiivinen ennustearvo (Negative Predictive Value, NPV) laskettiin, ja sarjan PPV oli 88,33 % (53/60 tutkittavaa, 95 %:n CI: 77,27 %, 93,57 %), jossa NPV oli 98,08 % (153/156 tutkittavaa; 95 %:n CI: 94,8 %, 99,4 %).

Taulukko 21. Herkkyden, spesifisyyden, PPV:n ja NPV:n analyysit (arvioitava populaatio)

Muuttuja	Arvio (%)	Alempi 95 %:n luottamusraja (%)	Ylempi 95 %:n luottamusraja (%)
Herkkyys	94,64	85,13	98,88
Spesifisyys	95,62	91,19	98,22
PPV	88,33	77,27	93,57
NPV	98,08	94,8	99,4

Negatiivisen testin todennäköisyysuhde käytettäessä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa PV-diagnosiin WHO:n diagnostisia kriteerejä noudattaen oli 21,6 (95 %:n CI; 10,44, 44,71), mikä osoitti, että JAK2 V617F -positiivinen tulos on todennäköisempi tutkittavilla, joilla on PV, kuin tutkittavilla, joilla ei ole PV:tä.

Positiivisen testin todennäköisyysuhde käytettäessä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa PV-diagnosiin WHO:n diagnostisia kriteerejä noudattaen oli 0,06 (95 %:n CI; 0,02, 0,18), mikä osoitti, että JAK2 V617F -negatiivinen tulos ei ole yhtä todennäköinen tutkittavilla, joilla on PV, kuin tutkittavilla, joilla ei ole PV:tä.

Kliinisen tutkimuksen johtopäätökset

Analyseistä voidaan tehdä seuraavat johtopäätökset:

- Herkkyys oli 94,64 % (95 %:n CI; 85,13 %, 98,88 %), mikä osoitti että WHO:n diagnostisten kriteerien puitteissa *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan voidaan odottaa havaitsevan PV suurimmalla osalla tutkittavia, joilla on kyseinen sairaus.
- PV-diagnosin spesifisyys käytettäessä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa WHO:n diagnostisten kriteerien puitteissa oli 95,62 % (95 %:n CI; 91,19 %, 98,22 %), mikä osoitti, että määrittämisen voidaan myös odottaa sulkevan pois PV:n mahdollisuus suurimmalla osalla tutkittavista, joilla tätä sairautta ei ole.
- Käytettäessä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa WHO:n diagnostisten kriteerien puitteissa PPV oli 88,33 % (95 %:n CI; 77,27 %, 93,57 %) * ja NPV oli 98,08 % (95 %:n CI; 94,8 %, 99,4 %).
- Negatiivisen testin todennäköisyysuhde käytettäessä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa PV-diagnosiin WHO:n diagnostisia kriteerejä noudattaen oli 21,61 (95 %:n CI; 10,44, 44,71), mikä osoitti, että JAK2 V617F -positiivinen tulos on todennäköisempi tutkittavilla, joilla on PV, kuin tutkittavilla, joilla ei ole PV:tä.

* PPV riippuu sairauden esiintyvyydestä. Koska sairauden esiintyvyys oli tutkimuspopulaatiossa matala ja herkkyys ja spesifisyys ovat esiintyvyydestä erillisiä, herkkyys ja spesifisyys ovat merkityksellisempiä.

- Positiivisen testin todennäköisyysuhde käytettäessä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa PV-diagnnoosiin WHO:n diagnostisia kriteerejä noudattaen oli 0,06 (95 %:n CI; 0,02, 0,18), mikä osoitti, että JAK2 V617F -negatiivinen tulos on paljon epätodennäköisempi tutkittavilla, joilla on PV, kuin tutkittavilla, joilla ei ole PV:tä.

Turvallisuuden ja suorituskyvyn yhteenveto

Turvallisuuden ja suorituskyvyn yhteenveto-osion voi ladata *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan tuotteen verkkosivulta: resources.qiagen.com/674623. Se on löydettävissä myös EUDAMED-verkkosivulta.

Hävittäminen

- Hävitä näyte- ja määritysjäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.
- Kaikki kemikaalit ja biologiset aineet ovat mahdollisesti vaarallisia. Näytteet ovat mahdollisesti vaarallisia, ja niitä on kohdeltava biologisesti vaarallisina materiaaleina.
- DNA:n eristämisen aikana käytetyt näyteputket, levyt ja jäte on hävitettävä paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.
- qPCR-protokollan aikana käytetyt liuskaputket on hävitettävä paikallisten turvamääräysten mukaan.

Lähdeviitteet

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.

Vianmääritys

Tämä vianmääritysohje voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Jos tarvitset teknistä tukea tai lisätietoja, käy teknisen tukemme sivuilla osoitteessa www.qiagen.com/Support (katso yhteystiedot osoitteesta www.qiagen.com).

Katso lisätiedot eristysarjojen QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (tuotenro 61104) ja QIASymphony DSP DNA Mini Kit (tuotenro 937236) vianmäärityksestä soveltuvista käsikirjoista. Katso Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston vianmääritysohjeet *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöoppaasta*.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Automaattinen eristys

- | | |
|--|---|
| a) Näyte merkitty unclear (epäselvä) | Tämä voi johtua tauosta eristysajon aikana. Jos eristysajo valmistui, jatka OD-suhteen ja pitoisuuden mittaamisvaiheeseen. Jos ei valmistunut, toista eristysajo. |
| b) Näyte merkitty unprocessed (käsitlemätön) | Tämä tarkoittaa näytteen alkumäärän virhettä. Tarkista veren määrä pipetoimalla. Jos määrä on liian pieni, suurennä näytemäärä 300 µl:aan ja aloita ajo uudelleen. |
| c) Näyte merkitty invalid (epäkelpollinen) | Eristysajon aikana tapahtui virhe. Toista tämän näytteen eristysvaihe. |
| d) Jäähdytyslevyn lämpötilavirhe | Ajon lopussa näkyviin tuleva jäähdytyslämpötilasta ilmoittava virheilmoitus tarkoittaa, että näytteitä pidettiin huoneenlämmössä (15–25 °C) eristysajon lopusta. Jos näytteitä pidettiin huoneenlämmössä alle 12 tuntia, genomisen DNA:n laadun ei pitäisi olla muuttunut ja genomisen DNA voidaan kvantifioida. Jos aika oli yli 12 tuntia, genomisen DNA:n näytteet ovat voineet pilaantua. Tässä tapauksessa eristys on toistettava. |

Huomautuksia ja ehdotuksia

- e) Eluutiolevyn poistovirhe Ajon lopussa näkyviin toi tulla virheviesti, jos eluutiolevy on poistettu tarkistamatta asianmukaista toimintoa näytöstä. Tämä voidaan korjata napsauttamalla asianmukaista ruutua.

JAK2-mutaation tilan arvioinnin yleinen käsittely *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla

Kopioiden kokonaismäärä ei ole riittävä ja vastaava näyte on epäkelpo: monistus on liian vähäistä

- a) Tarkista A_{260}/A_{280} -suhde. Jos se on alle 1,7, tee uusi DNA:n eristys.
- b) Tarkista DNA-pitoisuus. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on optimoitu toimimaan työskentelypitoisuudella 10 ng/μl.
Jos DNA-pitoisuus ei ole tämä pitoisuus, laimenna tai eristä DNA uudelleen kokoverestä.
- c) Jos molemmat parametrit täyttyvät, pipetointimäärät voivat olla virheelliset. Tarkista pipetit ja kalibroi ne uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista.

Kontrollin ajo epäonnistuu QS-standardilla

- a) Pullon käntö ylösalaisin Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Korvaa kaikki kriittisen tärkeät reagenssit ja toista koe uusilla alikvooteilla.
- b) Käntö ylösalaisin jakelun aikana Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja tarvikkeita aina yleisesti hyväksytyjen käytäntöjen mukaan, jotta siirtymiskontaminaatiota ei tapahtuisi.
- c) Ristikontaminaatio Säilytä sarjan sisältö $-30...-15$ °C:ssa ja suojaa reaktioseokset valolta.
- d) Standardin osittainen pilaantuminen Vältä toistuvaa jäädytystä ja sulatusta.
- e) PCR-reagenssien osittainen pilaantuminen
- f) Epäspesifinen monistus

Ei signaalia tai heikko signaali yhdestä standardista

- a) Homegeenisyysongelma Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
- b) Saman reaktioseoksen käyttö WT ja MT QS:ään Suorita PCR-ajo uudelleen.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Mallittomassa kontrollissa (No Template Control, NTC) havaitaan positiivinen monistuminen

- | | |
|--|--|
| a) Ristikontaminaatio | Vaihda kaikki kriittisen tärkeitä reagenssit. |
| b) Reagenssin kontaminaatio | Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja tarvikkeita aina yleisesti hyväksytyjen käytäntöjen mukaan, jotta siirtymiskontaminaatiota ei tapahtuisi. |
| c) Liuskaputket ovat vaihtuneet keskenään (NTC-paikkaan on asetettu JAK2 V617F -positiivista mallia) | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. |
| d) Koettimen pilaantuminen | Säilytä reaktioseokset suojattuna valolta.
Tarkista, näkykö fluoresenssikäyrässä virheellisesti positiivinen tulos. |

Ei signaalia edes standardikontrolleissa

Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois

Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Suorita PCR-ajo uudelleen.

Puuttuva tai heikko sisäisen kontrollin signaali näytteistä ja/tai kokonaiskopiomäärä (Total Copy Number, TCN) alittaa kelvollisuusalueen, mutta ajon kontrollit ovat kelvollisia

Riittämättömästä puhdistuksesta johtuvat näytemateriaalin inhibitoriset vaikutukset

Tarkista aina DNA:n laatu mittaamalla A_{260}/A_{280} -suhde ja pitoisuus ennen aloittamista.

Toista DNA:n valmistelu.

Vilityypin kontrolli (Wild-Type Control, WTC) on positiivinen, mutta mutanttikontrolli (Mutant Control, MTC) ei ole tarpeeksi positiivinen

Siirtymiskontaminaatio

Vaihda kaikki kriittisen tärkeitä reagenssit.
Toista koe käyttämällä kaikista reagensseista uusia alikvootteja.
Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja tarvikkeita aina yleisesti hyväksytyjen käytäntöjen mukaan, jotta siirtymiskontaminaatiota ei tapahtuisi.
Varmista, että kärjet vaihdetaan eri reagenssien pipetoinnin välillä.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Villityypin kontrolli (Wild-Type Control, WTC) monistettu MT-reaktioseoksella (WT-reaktioseoksen sijaan) ja mutanttikontrolli (Mutant Control, MTC) monistettu WT-reaktioseoksella (MT-reaktioseoksen sijaan)

- | | |
|--|--|
| a) Ristikontaminaatio | Vaihda kaikki kriittisen tärkeät reagenssit. |
| b) Reagenssin kontaminaatio | Toista koe käyttämällä kaikista reagensseista uusia alikvooteja. |
| c) Putket sekoittuneet (WTC-putket asetettu MTC-paikkaan ja toisin päin) | Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja tarvikkeita aina yleisesti hyväksytyjen käytäntöjen mukaan, jotta siirtymiskontaminaatiota ei tapahtuisi.
Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. |

Positiivisen kontrollin käänteinen havainto

- | | |
|--|--|
| a) Ristikontaminaatio | Korvaa kaikki kriittisen tärkeät reagenssit ja toista koe uusilla alikvooteilla. |
| b) Reaktioseokset putkissa tai esiseoksessa ovat vaihtuneet keskenään. | Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja tarvikkeita aina yleisesti hyväksytyjen käytäntöjen mukaan, jotta siirtymiskontaminaatiota ei tapahtuisi.
Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. |

Ei signaalia näytteestä tai kontrollista, edes sisäisestä kontrollista

- | | |
|--|---|
| a) Reaktioseosta tai jotakin sen osista (esim. Taq-polymeraasi) ei ole lisätty | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Jos sisäistä kontrollia ei ole monistettu, reaktioseosta ei lisätty tai se on pilaantunut. |
| b) Reaktioseos on pilaantunut | Toista qPCR-vaihe uudella reaktioseoksella. |

Symbolit

Käyttöohjeessa tai pakkauksessa ja etiketeissä käytetään seuraavia symboleita:

Symboli

Selitys



<N>

Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon



Viimeinen käyttöpäivämäärä



Tämä tuote täyttää in vitro -diagnostisia lääkinnällisiä laitteita koskevan eurooppalaisen säännöksen 2017/746 vaatimukset.

IVD

Diagnostinen in vitro -lääkintälaitte

REF

Tuotenumero

LOT

Eränumero

MAT

Materiaalinumero (ts. komponentin merkintä)

GTIN

GTIN-numero

UDI

Yksilöllinen laitetunniste

CONT

Sisältö

COMP

Komponentti

NUM

Numero

Rn

R tarkoittaa käyttöohjeiden versiota ja n on versionumero

Symboli

Selitys



Lämpötilarajoitus



Valmistaja



Katso käyttöohjeet, jotka voi ladata osoitteesta
resources.qiagen.com/674623



Suojattava valolta



Huomio, lue oheisasiakirjat

Tilastiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	24 reaktioon: villityypin JAK2-geenikontrolli, JAK2 V617F -kontrolligeeni, JAK2-villityypin kvantifiointistandardit, JAK2-mutaation kvantifiointistandardit, JAK2-villityypin reaktioseos, JAK2-mutanttireaktioseos, Taq DNA-polymeraasi, TE-puskuri laimennukseen, vettä NTC:hen	674623
Liittyvät tuotteet		
Rotor-Gene Q MDx – IVD-validoituun real-time PCR -analyysiin kliinisessä käytössä		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR -syklieri ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, ei sis. asennusta ja koulutusta	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR -syklieri ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Ohjelmisto rutiinitestaukseen yhdessä Rotor-Gene Q -laitteen kanssa	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Yksi ohjelmistolisenssi asennettavaksi yhdelle tietokoneelle	9025620

Tuote	Sisältö	Tuotenro
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumiininen levy manuaaliseen reaktion valmisteluun yksikanavaisella pipetillä 72 x 0,1 ml:n putkia	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 neljän putken ja korkin liuskaa, 1 000 reaktioon	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 neljän putken ja korkin liuskaa, 10 000 reaktioon	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	50 preparaatiota varten: QIAamp Mini Spin Column -pyörityskolonniputket, puskureita, reagensseja, putkia, VacConnectors	61104
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit	192 preparaattia, kukin 200 µl: Sisältää 2 reagenssikasettia ja entsyymitelinettä tarvikkeineen.	937236
QIAsymphony SP and accessories		
QIAsymphony SP System	QIAsymphony-näytteenpreparointimoduuli: sisältää asennuksen ja koulutuksen sekä 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalle	9001751
QIAsymphony SP	QIAsymphony-näytteenpreparointimoduuli: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalle	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-kuoppaiset näytteenvalmistelukasetit, QIAsymphony SP:n kanssa käytettäväksi	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers QIAsymphony SP:n kanssa käytettäväksi	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä; (8 x 128). Käytettäväksi QIAcube®- ja QIAsymphony SP/AS -instrumenttien kanssa	990332

Tuote	Sisältö	Tuotenro
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä; (8 x 128). Käytettäväksi QIASymphony SP/AS -laitteiden kanssa	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Ei-steriilit polypropyleeniputket (enimmäiskapasiteetti 0,85 ml, säilytyskapasiteetti vähemmän kuin 0,7 ml, eluutiokapasiteetti 0,4 ml); 2 304 kpl 96 kpl:n telineissä; sisältää korkkiliuskat	19588
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7 000 yksikköä/ml, liuos)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml kudoslyysauspuskuria 1000 preparaattiin	19076

Katso päivitettyt lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet vastaavan QIAGEN-sarjan käyttöoppaasta. QIAGEN-sarjojen käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Asiakirjan muutoshistoria

Versio

Kuvaus

R1, Heinäkuu 2022

Ensimmäinen versio

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

ipsogen® JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan rajoitettu lisenssisopimus

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käyttöohjeen mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä immateriaaliomaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käyttöohjeessa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti ovat kiellettyjä.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Paneelin ostaja tai käyttäjä suostuu siihen, ettei hän suorita tai anna muiden suorittaa toimenpiteitä, jotka voisivat johtaa edellä mainittuihin kiellettyihin tapahtumiin tai edesauttaa niiden syntymistä. QIAGEN saattaa vedota tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kieltoihin tuomioistuimessa. QIAGEN perii kaikki tutkinta- ja oikeuskulut asianajajan palkkiot mukaan lukien, jotka aiheutuvat tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sen henkistä omaisuutta koskevien oikeuksien toimeenpanemisesta paneeliin ja/tai sen osien osalta.

Katso päivitetetyt käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

Tavaramerkit: QIAGEN®, *ipsogen*®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony®, HotStarTaq®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

07/2022 HB-2872-001 1123592 © 2022 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset www.qiagen.com/shop | Tekninen tuki support.qiagen.com | Verkkosivusto www.qiagen.com