

# Bruksanvisning for *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 RGQ PCR Kit



Versjon 2

**IVD**

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Til bruk sammen med Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM-instrument



0197

**REF**

674623



QIAGEN, GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R1 **MAT**

1123592NB



# Innhold

Tiltent bruk.....	6
Tiltent bruker.....	6
Beskrivelse og prinsipp.....	7
Oppsummering og forklaring.....	7
Prosedyreprinsipp.....	11
Materialer som medfølger.....	15
Settets innhold.....	15
Settets innhold (forts.).....	16
Komponenter i settet.....	17
Materialer som er nødvendige, men ikke følger med.....	19
Forbruksmaterialer og reagenser for manuell DNA-ekstraksjon.....	19
Forbruksmaterialer og reagenser for automatisert DNA-ekstraksjon.....	19
Forbruksmaterialer og reagenser for PCR.....	19
Utstyr.....	20
Utstyr for prøveklargjøring.....	20
Utstyr for real-time PCR.....	20
Advarsler og forholdsregler.....	21
Sikkerhetsinformasjon.....	21
Nødsinformasjon.....	21
Forsiktighetsregler.....	22
Håndtering og oppbevaring av reagenser.....	24
Fraktbetingelser.....	24

Oppbevaringsforhold.....	24
Stabilitet under bruk.....	24
Oppbevaring og håndtering av prøver.....	26
Fullblodsprøver.....	26
Genomisk DNA-prøver.....	26
Protokoll: Genomisk DNA-ekstraksjon og klargjøring fra fullblod.....	27
Manuell ekstraksjon av genomisk DNA med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.....	27
Automatisert ekstraksjon av genomisk DNA med QIAasymphony DSP DNA Mini Kit.....	31
Kvalifisering og kvantifisering av DNA.....	36
Genomisk DNA-prøvenormalisering.....	36
Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.....	37
Installasjon av Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneprogramvaren.....	38
Installasjon av Gamma Plug-in og import av analyseprofil.....	38
Prøvebehandling på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor for 72 rør.....	42
qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor for 72 rør.....	45
Tolkning av resultater.....	58
Begrensninger.....	65
Ytelsesegenskaper.....	67
Analytisk ytelse.....	67
Testing av WHO's internasjonale referansepanel for genomisk JAK2 V617F (NIBSC, panelkode 16/120).....	75
Klinisk ytelse.....	82
Oppsummering av sikkerhet og ytelse.....	89

Avfallshåndtering.....	90
Referanser.....	91
Feilsøkningsveiledning.....	93
Symboler .....	98
Bestillingsinformasjon .....	100
Endringshistorikk for dokument .....	103

## Tiltenkt bruk

*ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 RGQ PCR Kit er en kvantitativ in vitro PCR-analyse beregnet på påvisning og kvantifisering av JAK2 V617F/G1849T-mutasjon i genomisk DNA ekstrahert fra humant perifert fullblod antikoagulert med 2K-EDTA. Resultater oppnådd med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er beregnet for bruk som et tilbehør ved evaluering av mistenkt Philadelphia-kromosom (Ph) negativ myeloproliferativ neoplasi (MPN) og molekylær sykdomsovervåking hos MPN-pasienter. Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniske-patologiske funn.

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er kun beregnet for bruk med QIAGEN Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM-instrumentet og andre validerte arbeidsflytkomponenter som angitt i bruksanvisningen. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er ikke en automatisert enhet, men analysen støttes av dedikert programvare.

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er beregnet for bruk i in vitro-diagnostikk.

## Tiltenkt bruker

Dette settet er beregnet for profesjonell bruk.

Produktet skal bare brukes av fagpersoner som har fått spesialinstruksjoner og opplæring i molekylærbiologiske teknikker og som er kjent med denne teknologien. Enhetsprosedyren skal implementeres i et molekylærbiologisk laboratoriemiljø.

# Beskrivelse og prinsipp

## Oppsummering og forklaring

En tilbakevendende somatisk mutasjon, *V617F*, som påvirker Janus-tyrosinkinase 2-genet (*JAK2*), ble identifisert i 2005 (1–4) og førte til et viktig gjennombrudd innen forståelse, klassifisering og diagnostisering av MPN. *JAK2* er et avgjørende intracellulært signaliseringsmolekyl for en rekke cytokiner, deriblant erythropoietin.

*JAK2 V617F*-mutasjonen er påvist hos >95 % av pasienter med polycythemia vera (PV) og hos ca. 60 % av pasienter med essensiell trombocytemi (ET) og primær myelofibrose (PMF) (5). *JAK2 V617F* er også påvist i sjeldne tilfeller av kronisk myelomonocytisk leukemi, myelodysplastisk syndrom (MDS), systemisk mastocytose og kronisk nøytrofil leukemi, men i 0 % av kronisk myelogen leukemi (KML) (6).

*JAK2 V617F*-mutasjonen er en enkeltnukleotidendring av *JAK2*-nukleotid 1849 i ekson 14, som fører til en unik valin (V)-til-fenylalanin (F)-substitusjon i posisjon 617 i proteinet (JH2-domene). *JAK2*-genet koder en tyrosinkinase som er involvert i cytokinreseptorsignalisering gjennom STAT-banen. Når den aktiveres konstitutivt, som oftest ved *JAK2 V617F*-mutasjonen, er resultatet en omdanning av erytroidprogenitorer, overfølsomhet mot erythropoietin og aktivering av nedstrøms signalveier. Det er også satt frem hypotese om at feilregulert *JAK2* fremmer uttrykk av onkogen, mitotisk rekombinasjon og genetisk ustabilitet (7).

Tradisjonelt var diagnosen MPN basert på klinisk benmargshistologi og cytogenetiske kriterier. Oppdagelsen av en sykdomsspesifikk molekylær markør førte til både en enklere prosess og økt diagnostisk nøyaktighet. Påvisning av *JAK2 V617F*-mutasjonen er nå en del av 2016-referansekrteriene fra Verdens helseorganisasjons (World Health Organization, WHO) for diagnostisering av BCR-ABL-negativ MPN (8) (Tabell 1), og forekomst av denne mutasjonen er et hovedkriterium for diagnostisk bekreftelse.

**Tabell 1. WHO-kriterier for diagnostisering av MPN**

**Kriterier for diagnostisering av PV**

Hovedkriterium	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Hemoglobin (Hgb) &gt;16,5 g/dl (menn) eller &gt;16,0 g/dl (kvinner) eller hematokrit &gt;49 % (menn) eller &gt;48 % (kvinner) eller økt rød blodcellemasse &gt;25 % over gjennomsnittlig normal forventet verdi.</li><li>2. Benmargsbiospi (BM) viser hypercellularitet for alder med trilineær vekst (panmyelose), inkludert prominent erytroid, granulocytisk og megakaryocytisk proliferasjon med pleomorfe, modne megakaryocytter (størrelsesforskjeller).</li><li>3. Forekomst av JAK2V617F eller JAK2 ekson 12-mutasjon</li></ol>
Bikriterium	Sub normalt erytropoietinnivå i serum

Diagnostisering av PV krever enten at alle de 3 hovedkriteriene eller de 2 første hovedkriteriene og bikriteriet† er oppfylt.

† Kriterium nummer 2 (BM-biospi) kreves kanskje ikke i tilfeller med vedvarende absolutt erythrocytose: hemoglobinnivåer >18,5 g/dl hos menn (hematokrit, 55,5 %) eller >16,5 g/dl hos kvinner (hematokrit, 49,5 %) hvis hovedkriterium 3 og bikriteriet er til stede. Innledende myelofibrose (til stede hos opptil 20 % av pasienter) kan imidlertid bare påvises ved å utføre en BM-biospi; dette funnet kan anslå en raskere progresjon for påvist myelofibrose (post-PV MF).

**Kriterier for diagnostisering av ET**

Hovedkriterium	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Blodplateantall <math>\geq 450 \times 10^9/l</math></li><li>2. BM-biospi viser proliferasjon hovedsakelig i megakaryocytlinjen med økt antall forstørrede, modne megakaryocytter med hyperlobulære kjerner. Ingen signifikant økning eller venstreskift i nøytrofil granulopoiese eller erytropoiese og veldig sjelden liten (grad 1) økning i retikulinfibre.</li><li>3. Oppfyller ikke WHO-kriteriene for BCR-ABL1<sup>+</sup> CML, PV, PMF, myelodysplastiske syndromer eller andre myelogene neoplasmer</li><li>4. Forekomst av JAK2, CALR eller MPL-mutasjon</li></ol>
Bikriterium	Forekomst av en klonal markør eller fravær av påvisning av reaktiv trombocytose

Diagnostisering av ET krever at alle de 4 hovedkriteriene oppfylles, eller de første 3 hovedkriteriene og bikriteriet.



## Kriterier for diagnostisering av prePMF

Hovedkriterium	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Megakaryocytisk proliferasjon og atypi, uten retikulinfibrose &gt; grad 1, sammen med økt aldersjustert BM-cellularitet, granulocytisk proliferasjon og ofte redusert erytropoiese</li><li>2. Oppfyller ikke WHO-kriteriene for <i>BCR-ABL1</i><sup>+</sup> CML, PV, ET, myelodysplastiske syndromer eller andre myelogene neoplasmer</li><li>3. Forekomst av <i>JAK2</i>, <i>CALR</i>, <i>MPL</i>-mutasjon eller ved fravær av disse mutasjonene, forekomst av en annen klonal markør,<sup>†</sup> eller fravær av mindre reaktiv BM-retikulinfibrose<sup>‡</sup></li></ol>
Bikriterium	Forekomst av minst 1 av følgende, bekreftet i 2 konsekutive påvisninger: <ol style="list-style-type: none"><li>a.) Anemi ikke tilskrevet et komorbid forhold</li><li>b.) Leukocytose <math>\geq 11 \times 10^9/l</math></li><li>c.) Palpabel splenomegali</li><li>d.) Laktatdehydrogenase (LDH) økt til over den øvre normale grensen for det institusjonelle referanseområdet</li></ol>

Diagnostisering av prePMF krever at alle de 3 hovedkriteriene oppfylles, og minst 1 bikriterium.

† Ved fravær av noen av de 3 store klonale mutasjonene bidrar søket etter de hyppigst medfølgende mutasjonene (f.eks. *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) til å fastslå den klonale karakteren til sykdommen.

‡ Mindre (grad 1) retikulinfibrose sekundært til infeksjon, autoimmun sykdom eller andre kroniske betennelsestilstander, hærceleukemi eller annen lymfoid neoplasme, metastatisk malignitet eller toksiske (kroniske) myelopatier.

## Kriterier for diagnostisering av tydelig PMF

Hovedkriterium	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Forekomst av megakaryocytisk proliferasjon og atypi, sammen med enten retikulino- og/eller kollagenfibrose grad 2 eller 3</li><li>2. Oppfyller ikke WHO-kriteriene for ET, PV, <i>BCR-ABL1</i><sup>+</sup> CML, myelodysplastiske syndromer eller andre myelogene neoplasmer</li><li>3. Forekomst av <i>JAK2</i>, <i>CALR</i>- eller <i>MPL</i>-mutasjon eller ved fravær av disse mutasjonene. Forekomst av en annen klonal markør,<sup>†</sup> eller fravær av reaktiv myelofibrose<sup>‡</sup></li></ol>
Bikriterium	Forekomst av minst 1 av følgende, bekreftet i 2 konsekutive påvisninger: <ol style="list-style-type: none"><li>a.) Anemi ikke tilskrevet et komorbid forhold</li><li>b.) Leukocytose <math>\geq 11 \times 10^9/l</math></li><li>c.) Palpabel splenomegali</li><li>d.) Laktatdehydrogenase (LDH) økt til over den øvre normale grensen for det institusjonelle referanseområdet</li><li>e.) Leukoerytoblastose</li></ol>

Diagnostisering av tydelig PMF krever at alle de 3 hovedkriteriene oppfylles og minst 1 bikriterium

† Ved fravær av noen av de 3 store klonale mutasjonene bidrar søket etter de hyppigst medfølgende mutasjonene (f.eks. *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) til å fastslå den klonale karakteren til sykdommen.

‡ BM-fibrose sekundært til infeksjon, autoimmun sykdom eller andre kroniske betennelsestilstander, hårcelleleukemi eller annen lymfoid neoplasme, metastatisk malignitet eller toksiske (kroniske) myelopatier.

**Merk:** KML: Kronisk myelogen leukemi; ET: Essensiell trombocytemi; PMF: Primær myelofibrose; PV: Polycythemia vera; WHO: Verdens helseorganisasjon

I tillegg har oppdagelsen av *JAK2 V617F*-mutasjon hos MPN-pasienter avdekket et nytt mål for behandlinger. Molekylær sykdomsovervåking som måler *JAK2 V617F*-mutasjonsbyrden, har vist seg å være nyttig for å vurdere respons på behandling og forutsi tilbakefall hos pasienter som har gjennomgått allogen stamcelletransplantasjon (9). Konseptene med molekylær respons er tydelig fastslått av de nyeste anbefalingene fra European LeukemiaNet (ELN) og International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) (10, 11) og er henviset til i retningslinjene fra National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (12) og European Society of Medical Oncology (ESMO) (5). Komplet molekylær respons ble definert som bekjempelse av en foruteksisterende molekylær abnormitet og delvis molekylær respons som en reduksjon på  $\geq 50\%$  i *JAK2 V617F*-mutantallelbyrde (delvis respons gjelder kun for pasienter med minst 20 % *JAK2 V617F*-mutantallelbyrde ved baseline) (10,11).

Siden 2006 har flere metoder, hovedsakelig basert på PCR-teknikker eller sekvensering, vært tilgjengelige som laboratorieutviklede tester for å påvise forekomsten av og potensielt kvantifisere *JAK2 V617F*. Disse testene har forskjellig analytisk ytelse, særlig hva angår presisjon og sensitivitetsnivå. Denne forskjellen kan påvirke behovet for benmargsanalyse, tiden det tar å etablere en endelig diagnose, og potensielt diagnostisk og molekylær sykdomsovervåkingsytelse.

På grunn av det store utvalget av potensielle *JAK2 V617F*-mutantallelfraksjoner som kan ses i MPN (med nivåer så lave som 1 %), oppfordres laboratorier til å tilby *JAK2 V617F*-mutasjonstesting med høy analytisk sensitivitet. Egnede teknikker skal ha en lav deteksjonsgrense (minst 1 % for diagnostisering og minst 0,1 % for molekylær sykdomsovervåking) og en høy reproduserbarhet (5,13).

## Prosedyreprinsipp

Flere ulike teknikker er foreslått for kvantitativt å bestemme andelen av enkeltnukleotidpolymorfismer (single nucleotide polymorphisms, SNP-er) i DNA-prøver. Noen av disse, f.eks. smeltekurve og sekvensering, er kun semikvantitative. Metoder basert på sanntids kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR) er foretrukket fordi de har høyere sensitivitet. Bruk av en SNP-spesifikk primer tillater selektiv amplifikasjon av mutant (MT)-allelet eller villtype (WT)-allelet som enkelt kan påvises på et sanntids qPCR-instrument. Dette gir en sensitivitet <0,1 %, som er i tråd med den for øyeblikket akseptable *JAK2*-cutoff på 1 % som brukes for klinisk positivitet for diagnostisering og den anbefalte deteksjonsgrensen for *JAK2 V617F*-allelbyrden på  $\leq 0,1$  % for overvåking av molekylær sykdom (5,13). Det er imidlertid viktig å bemerke at enkelte kliniske eksperter vurderer forekomsten av enhver *JAK2 V617F*-mengde som klinisk signifikant på diagnostidspunktet, og at det derfor er nødvendig med en sensitiv metode, f.eks. qPCR (14). *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* er basert på denne teknikken.

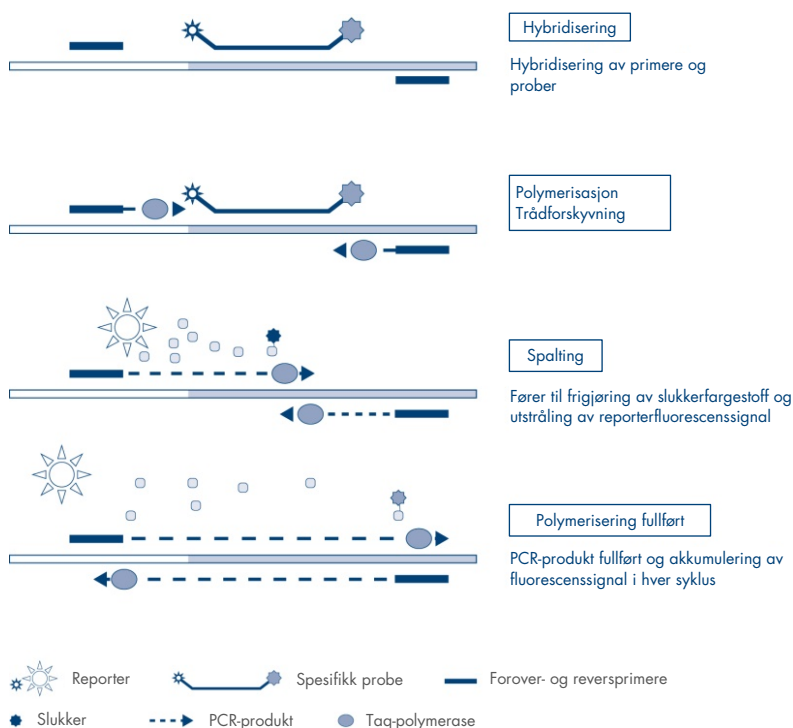
Bruken av qPCR tillater nøyaktig kvantifisering av PCR-produkter under den eksponensielle fasen av PCR-amplifikasjonsprosessen. Kvantitative PCR-data kan oppnås raskt, uten PCR-behandling i etterkant, gjennom deteksjon i sanntid av fluorescenssignaler under og/eller etter PCR-syklusene, og reduserer dermed drastisk risikoen for kontaminering av PCR-produkter. Per i dag finnes det tre hovedtyper av qPCR-teknikker: qPCR-analyse ved bruk av SYBR® Green I Dye, qPCR-analyse ved bruk av hydrolyseprober og qPCR-analyse ved bruk av hybridiseringsprober.

QIAGEN-analysen benytter qPCR-prinsippet for hydrolyse av oligonukleotid. Under PCR hybridiseres forover- og reversprimere til en spesifikk sekvens. Blandingen inneholder også et annet fargebundet oligonukleotid. Denne proben, som består av et oligonukleotid merket med et 5'-reporterfargestoff og en nedstrøms, fargeløs 3'-slukker, hybridiseres til en målsekvens i PCR-produktet. qPCR-analysen med hydrolyseprober benytter 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten i *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA-polymerasen. Når proben er intakt, vil reporterfargestoffets nærhet til slukkeren føre til suppresjon av reporterfluorescensen primært ved energioverføring av Förster-typen.

Hvis interessenålet er til stede under PCR, hybridiseres både forover- og reversprimerne spesifikt og flankerer proben. 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten til DNA-polymerasen spalter proben mellom reporterfargestoffet og slukkeren kun hvis de tre oligonukleotidene hybridiseres til målet. Probefragmentene forflyttes deretter fra målet, og polymerisasjon av tråden fortsetter. 3'-enden av proben blokkeres for å forhindre forlengelse av proben under PCR (Figur 1). Denne prosessen forekommer i hver syklus og forstyrrer ikke den eksponentielle produktakkumuleringen.

Økningen i fluorescenssignal registreres kun hvis målsekvensen er komplementær til primerne og dermed amplifisert under PCR. Disse betingelsene gjør at uspesifikk amplifikasjon ikke blir detektert. Økningen i fluorescens blir dermed direkte proporsjonal med målampifikasjonen under PCR.

I qPCR kalles antallet PCR-sykluser som kreves for å påvise et signal over terskelen, for krysspunkt (Crossing point, Cp) eller syklusterskel (Cycle threshold, CT) og er direkte proporsjonalt med mengden av målet som finnes på starten av reaksjonen.

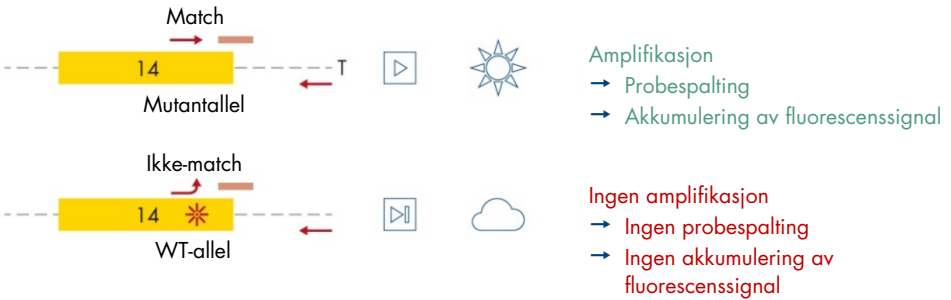


**Figur 1. Reaksjonsprinsipp.** Den kvantitative allelspesifikke PCR-teknologien som er brukt i dette analysesettet, muliggjør sensitiv, nøyaktig og svært reproducerbar påvisning av SNP-er. Denne teknikken er basert på bruk av spesifikke reversprimere for henholdsvis villtype- og V617F-allel (15). Overensstemmelsen mellom primer og mål-DNA må være perfekt for å muliggjøre forlengelse og amplifikasjon i PCR-reaksjon (Figur 2).

## WT-reaksjonsblanding



## MT-reaksjonsblanding



**Figur 2. Allelespesifikk PCR.** Bruk av villtype- eller V617F-primere og probeblanding muliggjør spesifikk påvisning av villtypeallel eller mutert allel i to separate reaksjoner utført ved bruk av samme prøve. Resultater kan uttrykkes som en prosentandel av mutantkopier blant totale JAK2-kopier. MT: mutant; WT: villtype.

# Materialer som medfølger

## Settets innhold

*ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit*

**24**

**Katalognr.**

**674623**

Farge	ID	Rør-ID	Volum
Rød	JAK2 Mutant Control (JAK2-mutantkontroll) (100 % V617F-allel)	MT Ctrl	33 µl
Grønn	JAK2 WT Control (JAK2-villtypekontroll) (100 % villtypeallel)	WT Ctrl	33 µl
Rød	JAK2 MT Quant Standard 1 (JAK2-quantifiseringsstandard for mutant 1) (5 x 10 <sup>1</sup> V617F-kopier/5 µl)	MT QS1	20 µl
Rød	JAK2 MT Quant Standard 2 (JAK2-quantifiseringsstandard for mutant 2) (5 x 10 <sup>2</sup> V617F-kopier/5 µl)	MT QS2	20 µl
Rød	JAK2 MT Quant Standard 3 (JAK2-quantifiseringsstandard for mutant 3) (5 x 10 <sup>3</sup> V617F-kopier/5 µl)	MT QS3	20 µl
Rød	JAK2 MT Quant Standard 4 (JAK2-quantifiseringsstandard for mutant 4) (5 x 10 <sup>4</sup> V617F-kopier/5 µl)	MT QS4	20 µl
Grønn	JAK2 WT Quant Standard 1 (JAK2-quantifiseringsstandard for villtype 1) (5 x 10 <sup>1</sup> villtypekopier/5 µl)	WT QS1	20 µl
Grønn	JAK2 WT Quant Standard 2 (JAK2-quantifiseringsstandard for villtype 2) (5 x 10 <sup>2</sup> villtypekopier/5 µl)	WT QS2	20 µl
Grønn	JAK2 WT Quant Standard 3 (JAK2-quantifiseringsstandard for villtype 3) (5 x 10 <sup>3</sup> villtypekopier/5 µl)	WT QS3	20 µl

## Settets innhold (forts.)

### *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit*

24

Katalognr.

674623

Farge	ID	Rør-ID	Volum
Grønn	JAK2 WT Quant Standard 4 (JAK2-quantifiseringsstandard for villtype 4) (5 x 10 <sup>4</sup> villtypekopier/5 µl)	WT QS4	20 µl
Rød	JAK2 MT Reaction Mix (JAK2 MT-reaksjonsblanding)	MT Mix	1010 µl
Grønn	JAK2 WT Reaction Mix (JAK2 WT-reaksjonsblanding)	WT Mix	1010 µl
Mint	Taq DNA polymerase (Taq DNA-polymerase) (HotStarTaq® 5 enheter/µl)	Taq	85 µl
Hvit	TE buffer for sample dilution (TE-buffert for prøvefortynning)	TE	1,9 ml
Hvit	Water for no template control (NTC) (Vann til ikke-templatkontroll (NTC))	NTC	1,9 ml
<i>ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit Handbook</i> (engelsk)			1



## Komponenter i settet

Settets hovedkomponenter blir beskrevet nedenfor.

**Tabell 2. Medfølgende reagenser**

Reagens	Virkestoffer	Volum
JAK2 Mutant Control (JAK2-mutantkontroll)	Cellelinje DNA-bærende 100 % V617F-allel	33 µl
JAK2 WT Control (JAK2 WT-kontroll)	Cellelinje DNA-bærende 100 % villtype-allel	33 µl
JAK2 MT Quant Standards (JAK2 MT-quantifiseringsstandarder) (QS1 til QS4)	Plasmid som bærer V617F-allelesekvensen	20 µl hver
JAK2 WT Quant Standards (JAK2 WT-quantifiseringsstandarder) (QS1 til QS4)	Plasmid som bærer WT-allelesekvensen	20 µl hver
JAK2 MT Reaction Mix (JAK2 MT-reaksjonsblanding)	Oligonukleotider for påvisning av MT-allel og intern kontroll, PCR-buffer, MgCl <sub>2</sub> , dNTP-er	1010 µl
JAK2 WT Reaction Mix (JAK2 WT-reaksjonsblanding)	Oligonukleotider for påvisning av WT-allel og intern kontroll, PCR-buffer, MgCl <sub>2</sub> , dNTP-er	1010 µl
Taq DNA polymerase (Taq DNA-polymerase)	Hot start Taq DNA-polymerase i oppbevaringsbuffer	85 µl
TE buffer for sample dilution (TE-buffer for prøvefortynning)	Tris-EDTA-bufferløsning	1,9 ml
Water for no template control (NTC) (Vann til ikke-templatkontroll (NTC))	Nuclease-free water (Nukleasefritt vann)	1,9 ml

## Reagenser

Reagensene som følger med dette settet, som er listet opp i Tabell 2 ovenfor, er de som trengs for å fortynne testprøver til påkrevd volum, og for å utføre qPCR-reaksjonene for påvisning og kvantifisering av *JAK2*-mutant- og villtype-alleler, for å påvise prosentandelen mutasjon. Den interne amplifikasjonskontrollen som er inkludert i reaksjonsblandingene, brukes til å overvåke qPCR-hemming og for å utelukke feil ved PCR-reaksjonen ved negative resultater.

## Kontroller og standarder

To kontroller er inkludert i settet: en *JAK2*-mutantkontroll brukt som en positiv kontroll for *JAK2*-mutantreaksjonsblandingen (MT) og en *JAK2*-villtypekontroll (WT) brukt som en positiv kontroll for *JAK2*-villtypereaksjonsblandingen (WT). Nukleasefritt vann følger med for å utføre en ikke-templatkontroll for begge reaksjonsblandinger.

Det følger fire kvantifiseringsstandarder (QS) for *JAK2*-mutant (MT) og fire kvantifiseringsstandarder for *JAK2*-villtype (WT) med i settet. De brukes til å beregne *JAK2* MT- og WT-kopinumre og etterfølgende *JAK2* V617F-mutasjonsprosentandelen for testprøvene.

# Materialer som er nødvendige, men ikke følger med

## Forbruksmaterialer og reagenser for manuell DNA-ekstraksjon

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr. 61104)
- Etanol (96–100 %)
- **Merk:** Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer, må ikke brukes, fordi det inneholder metanol eller metyletylketon.

## Forbruksmaterialer og reagenser for automatisert DNA-ekstraksjon

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

## Forbruksmaterialer og reagenser for PCR

Nukleasefrie, aerosolresistente, sterile PCR-pipettespisser med hydrofobe filtre

- 1,5 ml eller 2,0 ml nukleasefrie PCR-rør
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for Rotor-Gene Q (kat.nr. 981103 eller 981106)
- Is

## Utstyr

- Justerbare pipetter\* beregnet på PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Engangshansker
- Vorteksblender
- Varmebløkk for lysering av prøver ved 56 °C
- Bordsentrifuge\* med rotor for 0,5/1,5/2,0 ml reaksjonsrør (som kan oppnå 13 000–14 000 o/min)
- Spektrofotometer\*

## Utstyr for prøveklargjøring

- QIASymphony SP-instrument\* (kat.nr. 9001297), programvareversjon 4.0 eller nyere, tilgjengelig tilbehør og Blood\_200\_V7\_DSP-protokoll (eller nyere versjon)
- Tube Insert 3B (Rørrinnlegg 3B) (innlegg, 2,0 ml v2, prøvevogn (samplecarr.) (24), Qsym, kat.nr. 9242083)

## Utstyr for real-time PCR

- Real-time PCR-instrument\*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (kat.nr. 9002032) eller Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (kat.nr. 9002033) og tilgjengelig tilbehør
- Installert Rotor-Gene AssayManager®-programvareversjon 2.1.x (x≥0)
- Installert Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in versjon 1.0.x (x≥0)
- Importert ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR-analyseprofil (AP\_ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR\_V2\_0\_x.iap (x≥1))

\* Før bruk må du passe på at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.


# Advarsler og forholdsregler

Vær oppmerksom på at alvorlige hendelser i forbindelse med bruken av utstyret muligens må rapporteres til produsenten og/eller deres autoriserte representant og den ansvarlige myndigheten i det landet hvor brukeren og/eller pasienten befinner seg.

## Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

- Prøvene er potensielt smittefarlige. Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

<p><b>FORSIKTIG</b></p> 	<p>IKKE tilfør blekemidler eller sure løsninger direkte i prøve- eller klargjøringsavfallet.</p>
--	--

## Nødsinformasjon

CHEMTREC

Utenfor USA og Canada +1 703-527-3887

## Forsiktighetsregler

Bruk av qPCR-tester forutsetter god laboratoriepraksis, herunder vedlikehold av utstyr som er dedikert til molekylærbiologi, og må overholde relevante bestemmelser og standarder.

Dette settet er beregnet til bruk i in vitro-diagnostikk. Reagenser og instruksjoner i dette settet er godkjent for optimal ytelse.

- Testen skal brukes med fullblodsprøver som er antikoagulert med kalium-EDTA (K<sub>2</sub>-EDTA) og oppbevart ved 2–8 °C i maks. 96 timer før DNA-ekstraksjon.
- Alle kjemikalier og biologiske materialer er potensielt farlige. Prøver kan være smittefarlige og må behandles som smittefarlig biologisk materiale.
- Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.
- Reagenser for *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er optimalt fortynnet. Ikke fortynn reagensene mer, ettersom det kan føre til tap av ytelse.
- Bruk ikke reaksjonsvolumer (reaksjonsmiks pluss prøve) som er mindre enn 25 µl.
- Alle reagensene som følger med i *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, er utelukkende beregnet for bruk sammen med de andre reagensene i det samme settet. Ikke erstatt reagens fra et sett med samme reagens fra et annet *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, selv fra samme parti, ettersom dette kan påvirke ytelsen.
- Se bruksanvisningen for Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet, bruksanvisningen for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application, bruksanvisningen for Gamma Plug-In og bruksanvisningen for QIAasymphony SP-instrumentet for ekstra advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.
- Endring av inkubasjonstider og temperaturer kan føre til feilaktige eller uforenlige data.
- Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.
- Reaksjonsblandinger kan forandres hvis de utsettes for lys.
- Utvis ekstrem forsiktighet for å unngå kontaminering av blandingene med de syntetiske materialene i reagensene i JAK2 MT- og JAK2 WT-kvantifiseringsstandardene og med reagensene i JAK2-mutant- og JAK2 WT-kontrollene.

- Det er svært viktig å forhindre medrivingskontaminering av DNA- eller PCR-produkt, som kan føre til et falskt positivt signal.
- Det er svært viktig å forhindre kontaminering med DNase, som kan forårsake degradering av templat-DNA.
- Bruk individuelle, tilegnede pipetter til klargjøring av reaksjonsblandinger og tilsetning av templater.
- Ikke åpne Rotor-Gene Q MDx-instrumentet før kjøringen er ferdig.
- Ikke åpne Rotor-Gene Q-rørene etter at kjøringen er ferdig.
- Det er viktig at prøvetesting utføres riktig, og at man unngår feil ved innsetting av prøve, innlasting og pipettering.
- Sørg for at prøvene håndteres på en systematisk måte for å sikre riktig identifisering til enhver tid, slik at sporbarheten opprettholdes.
- Vi anbefaler derfor følgende:
  - Bruk nukleasefritt laboratorieutstyr (f.eks. pipetter, pipettespisser, reaksjonsflasker) og hansker når du utfører analysen.
  - Bruk nye aerosol-resistente pipettespisser for alle pipetteringsstrinn for å unngå krysskontaminering av prøver og reagenser.
  - Klargjør pre-PCR-masterblanding med dedikert materiale (pipetter, spisser osv.) i et dedikert område hvor ingen DNA-matriser (DNA, plasmid- eller PCR-produkter) blir innført. Tilsett templat i en separat sone (fortrinnsvis i et separat rom) med spesifikt utstyr (pipetter, spisser osv.).

For sikkerhetsinformasjon knyttet til ekstraksjonssettene QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr. 61104) og QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236) se de respektive håndbøkene.

# Håndtering og oppbevaring av reagenser

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene og oppbevaringsbetingelsene angitt på komponentenes esker og etiketter. Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.

## Fraktbetingelser

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit sendes på tørris. Hvis en komponent i *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (bortsett fra enzymet) ikke er frosset ved ankomst, hvis ytteremballasjen er blitt åpnet under frakt, eller hvis forsendelsen ikke inneholder en pakkseddel, brukerhåndbok eller reagenser, må du kontakte QIAGENs tekniske serviceavdeling eller lokale distributør (se bak på omslaget eller gå inn på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Oppbevaringsforhold

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit må umiddelbart settes til oppbevaring ved  $-30$  til  $-15$  °C etter mottak, i en mørk fryser med konstant temperatur.

For oppbevaringsinformasjon knyttet til ekstraksjonssettene QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr. 61104) og QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236) se de respektive håndbøkene.

## Stabilitet under bruk

Når *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit oppbevares under de spesifiserte oppbevaringsforholdene, er settet stabilt frem til utløpsdatoen angitt på eskens etikett.

Etter åpning kan reagenser oppbevares i originalemballasjen ved  $-30$  til  $-15$  °C i opptil 12 måneder. Gjentatt tining og frysing bør unngås. Maks. fem fryse-tine-sykluser kan utføres.



For informasjon om stabiliteten til ekstraksjonssettene QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr. 61104) og QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236) se de respektive håndbøkene.

- Bland forsiktig ved å vende røret 10 ganger, og sentrifuger alle rør, bortsett fra enzymet, før åpning.
- Utløpsdatoer for hvert reagens er angitt på de enkelte komponentenes etiketter. Under riktige oppbevaringsforhold vil produktet opprettholde ytelsen i stabilitetstiden som er angitt på etiketten på røret eller esken.
- **Merk:** Rør fra ulike partier skal ikke blandes. Alle komponenter i *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit som brukes i en test, må være fra samme parti. Kvalitetskontrollprosedyrer ved QIAGEN benytter funksjonell release-testing av settene for hver enkelt settlot. Reagenser fra forskjellige sett må derfor ikke blandes, selv om de er fra samme lot.

# Oppbevaring og håndtering av prøver

## Fullblodsprøver

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er beregnet for bruk med genomisk DNA-prøver ekstrahert fra fullblodsprøver som er antikoagulert med kalium-EDTA (K<sub>2</sub>-EDTA) og oppbevart på én av følgende måter:

- Ved 2–8 °C i opptil 96 timer
- Ved 15–25 °C i opptil 96 timer
- Frossent ved –30 til –15 °C i opptil 1 måned

**Merk:** Temperaturendringer mellom oppbevaring på prøvetaksstedet og frakt må unngås. Oppbevaringsforhold på teststedet skal være de samme som ved frakt eller lavere.

Alle prøver skal behandles som potensielt smittefarlige. Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

## Genomisk DNA-prøver

Så snart genomisk DNA er ekstrahert, kan DNA-prøver oppbevares og sendes ved –30 til –15 °C i maksimalt 24 måneder. Gjentatt frysing og opptining skal unngås. Maks. fire fryse-tine-sykluser kan benyttes.

# Protokoll: Genomisk DNA-ekstraksjon og klargjøring fra fullblod

## Viktige punkter før du starter


- Genomisk DNA skal ekstraheres ved hjelp av enten QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr. 61104) eller QIASymphony SP-instrumentet i kombinasjon med QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236).
- Kontroller at reagenser som skal brukes, ikke har gått ut på dato, og at de har vært transportert og oppbevart under korrekte forhold.
- **Merk:** *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er kun validert i kombinasjon med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr. 61104) eller QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236). Bruk ikke noe annet DNA-ekstraksjonsprodukt.

## Manuell ekstraksjon av genomisk DNA med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Manuell ekstraksjon av genomisk DNA må utføres med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr. 61104), som beskrevet i håndboken for QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (*QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook*).

## Håndtere reagenser

- Når du klargjør vaskebufferen for denne protokollen, skal du alltid blande den rekonstituerte vaskebufferen ved å vende flasken flere ganger før du starter prosedyren.
- Bruk pipettespisser med aerosolbarrierer når du pipetterer elusjonsbuffer fra flasken, og sett på lokket umiddelbart for å unngå kontaminering.
- Når du håndterer viskøse væsker, må du være ekstra forsiktig og bruke en egnet pipette for å sørge for at riktige volumer blir pipettert.
- Du må ikke berøre membranen på QIAamp Mini-spinnkolonnen med pipettespissen.

-  Ikke tilsett QIAGEN Protease (QP) direkte i lyseringsbufferen (AL).

## Ting du skal gjøre før du starter

- Stabiliser blodprøver til romtemperatur (15–25 °C), og påse at de er godt blandet.
- Klargjør lyseringsbuffer  
Hvis det er dannet presipitat i lyseringsbufferen (AL), må dette løses opp ved hjelp av inkubering ved 56 °C.
- Klargjør QIAGEN Protease  
Tilsett 1,2 ml proteaseløsemiddel (PS) i flasken med lyofilisert QIAGEN Protease (QP), og bland godt. For å unngå skumming blander du innholdet ved å vende flasken flere ganger. Påse at QIAGEN Protease (QP) er helt oppløst.  
**Merk:** Ikke tilsett QP direkte i lyseringsbufferen (AL).
- Klargjør vaskebuffer 1  
Bruk en målesylinder, og tilsett 25 ml etanol (96–100 %) i flasken som inneholder 19 ml konsentrert vaskebuffer 1 (AW1). Oppbevar rekonstituert vaskebuffer 1 (AW1) ved romtemperatur (15–25 °C).  
**Merk:** Bland alltid rekonstituert vaskebuffer 1 (AW1) ved å vende flasken flere ganger før prosedyren startes.
- Klargjør vaskebuffer 2  
Bruk en målesylinder, og tilsett 30 ml etanol (96–100 %) i flasken som inneholder 13 ml konsentrert vaskebuffer 2 (AW2). Oppbevar rekonstituert vaskebuffer 2 (AW2) ved romtemperatur (15–25 °C).  
**Merk:** Bland alltid rekonstituert vaskebuffer 2 (AW2) ved å vende flasken flere ganger før prosedyren startes.
- Klargjør elusjonsbufferen  
Én flaske med elusjonsbuffer (AE) følger med settet. For å unngå kontaminering av elusjonsbuffer (AE) anbefaler vi sterkt at det brukes pipettespisser med aerosolbarrierer ved pipettering av elusjonsbuffer (AE) fra flasken, og at korken på flasken settes på rett etterpå.

- Stabiliser elueringsbuffer (AE) til romtemperatur (15–25 °C).
- Still inn en varmeblokk til 56 °C for bruk i trinn 4 av prosedyren.

## Prosedyre

1. Pipetter 20 µl QIAGEN Protease (QP) i et lyseringsrør (Lysis Tube, LT).

**Merk:** Kontroller utløpsdatoen på den rekonstituerte proteasen før bruk.

2. Tilsett 200 µl blodprøve i lyseringsrøret (Lysis Tube, LT).

3. Tilsett 200 µl lyseringsbuffer (AL) i lyseringsrøret (Lysis Tube, LT), lukk lokket, og bland ved hjelp av pulsvorteksblending i 15 sekunder.

**Merk:** For å sikre lysering er det avgjørende at prøven og lyseringsbufferen (AL) blandes grundig for å fremskaffe en homogen løsning.

**Merk:** Siden lyseringsbufferen (AL) har høy viskositet, må du sørge for å tilføre riktig volum av lyseringsbuffer (AL) ved å pipettere nøye og bruke en egnet pipette.




Ikke tilsett QIAGEN Protease (QP) direkte i lyseringsbufferen (AL).

4. Inkuber ved 56 °C ( $\pm 1$  °C) i 10 minutter ( $\pm 1$  minutt).
  5. Sentrifuger lyseringsrøret (Lysis Tube, LT) i ca. 5 sekunder ved full hastighet for å fjerne dråpene fra innsiden av lokket.
  6. Tilsett 200 µl etanol (96–100 %) i lyseringsrøret (Lysis Tube, LT), lukk lokket, og bland godt ved hjelp av pulsvorteksblending i  $\geq 15$  sekunder.
  7. Sentrifuger lyseringsrøret (Lysis Tube, LT) i  $\geq 5$  sekunder ved full hastighet for å fjerne eventuelle dråper fra innsiden av lokket.
  8. Tilsett forsiktig hele lysatet fra trinn 7 til QIAamp Mini-spinnkolonnen uten at kanten blir våt. Du må ikke berøre membranen på QIAamp Mini-spinnkolonnen med pipettespissen.
- Merk:** Ved behandling av flere prøver skal du kun åpne ett lyseringsrør (Lysis Tube, LT) om gangen.

9. Lukk lokket på QIAamp Mini-spinnkolonnen, og sentrifuger ved ca. 6000 x g i 1 minutt. Plasser QIAamp Mini-spinnkolonnen i et rent vaskerør (Wash Tube, WT), og kast røret som inneholder filtratet.  
**Merk:** Hvis ikke alt lysatet har passert gjennom membranen etter sentrifugering ved 6000 x g (8000 o/min), sentrifuger igjen ved full hastighet (opptil 20 800 x g) i 1 minutt.  
**Merk:** Hvis lysatet fortsatt ikke passerer gjennom membranen under sentrifugeringen, kast prøven og gjenta isolasjon og rensing med nytt prøvemateriale.
10. Åpne forsiktig QIAamp Mini-spinnkolonnen, og tilsett 500 µl vaskebuffer 1 (AW1) uten at kanten blir våt. Du må ikke berøre membranen på QIAamp Mini-spinnkolonnen med pipettespissen.
11. Lukk lokket på QIAamp Mini-spinnkolonnen, og sentrifuger ved ca. 6000 x g (8000 o/min) i 1 minutt. Plasser QIAamp Mini-spinnkolonnen i et rent vaskerør (Wash Tube, WT), og kast røret som inneholder filtratet.
12. Åpne forsiktig QIAamp Mini-spinnkolonnen, og tilsett 500 µl vaskebuffer 2 (AW2) uten at kanten blir våt. Du må ikke berøre membranen på QIAamp Mini-spinnkolonnen med pipettespissen.
13. Lukk lokket på QIAamp Mini-spinnkolonnen, og sentrifuger ved full hastighet (ca. 20 000 x g eller 14 000 o/min) i 1 minutt. Plasser QIAamp Mini-spinnkolonnen i et rent vaskerør (Wash Tube, WT), og kast røret som inneholder filtratet.
14. Sentrifuger ved full hastighet (ca. 20 000 x g eller 14 000 o/min) i 3 minutter for å tørke membranen helt.
15. Plasser QIAamp Mini-spinnkolonnen i et rent elueringsrør (Elution Tube, ET), og kast vaskerøret (Wash Tube, WT) som inneholder filtratet. Åpne forsiktig lokket på QIAamp Mini-spinnkolonnen, og tilsett 50–200 µl elueringsbuffer (AE) midt på membranen. Lukk lokket, og inkuber ved romtemperatur (15–25 °C) i 1 minutt. Sentrifuger ved ca. 6000 x g (8000 o/min) i 1 minutt for å eluere DNA-et.
16. Kast brukte prøverør, plater og avfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

## Automatisert ekstraksjon av genomisk DNA med QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Automatisert ekstraksjon av genomisk DNA må utføres med QIASymphony-instrumentet i prøveklargjøringsmodulen (Sample Preparation, SP) sammen med QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236) i henhold til instruksjonene i *håndboken for QIASymphony DSP DNA Kit*. Protokollegenskaper som er spesifikke for bruk med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, er fremhevet med symbolet  i prosedyren nedenfor.

Med QIASymphony SP gjør QIASymphony DSP DNA Mini Kit det mulig med automatisert DNA-rensing fra humant fullblod (ved bruk av Blood\_200\_V7\_DSP-protokollen (eller nyere versjon) på QIASymphony SP).

- Ingen forbehandling er nødvendig.
- Rørene overføres direkte til QIASymphony SP.
- Rensing av DNA utføres med magnetpartikler.

### Viktige punkter før du starter

-  Det skal ekstraheres et fullblodvolum på 300 µl.

### Oppsett

- Det er viktig at du er kjent med bruken av QIASymphony SP. Se brukerhåndbøkene som medfølger instrumentene, for driftsinstruksjoner.

## Håndtere reagenser

- Før en reagenskasset tas i bruk for første gang, må du kontrollere at buffer QSL1 og buffer QSB1 ikke inneholder presipitat. Fjern om nødvendig karene med buffer QSL1 og buffer QSB1 fra reagenskassetten, og inkuber i 30 minutter ved 37 °C. Rist av og til for å løse opp presipitat. Pass på å sette karene tilbake på plass i riktig posisjon. Hvis reagenskassetten allerede er stukket hull på, sørg for at karene forsegles med gjenbrukbare tetningsstrips og inkuber hele reagenskassetten i 30 minutter ved 37 °C og rist innimellom i et vannbad.
- Ikke rist reagenskassetten (Reagent Cartridge, RC) for kraftig. Dette er for å unngå skumdannelse, noe som kan føre til problemer med deteksjon av væskeniå.

## Vedlikehold

- Valgfritt vedlikehold av QIASymphony SP er ikke obligatorisk, men anbefales på det sterkeste for å redusere risikoen for kontaminering.

## Ting du skal gjøre før du starter

- Før prosedyren påbegynnes, må du sikre at magnetpartiklene er helt resuspendert. Roter karet som inneholder magnetpartiklene, kraftig i minst 3 minutter før første gangs bruk.
- Sørg for at stikklokket plasseres på reagenskassetten og at lokket på magnetpartikkelkaret har blitt fjernet, eller hvis du bruker en delvis brukt reagenskasset, påse at de gjenbrukbare tetningsstrimlene har blitt fjernet.
- Husk å åpne enzymrørene.
- Hvis prøvene er strekkodet, plasser prøvene i rørbæreren slik at strekkodene vender mot strekkodeleseren på venstre side av QIASymphony SP.



## Prosedyre

1. Lukk alle skuffer og hetten.
2. Slå på QIAsymphony SP, og vent til skjermbildet "Sample Preparation" (Prøveklargjøring) vises og initialiseringsprosedyren er fullført.

**Merk:** Strømbryteren er plassert nederst i venstre hjørne av QIAsymphony SP.

3. Logg på instrumentet.
4. Kontroller at skuffen "Waste" (Avfall) er klargjort riktig, og utfør en skanning av beholdningen i skuffen "Waste" (Avfall), inkludert rennen for spisser og avfallsbeholderen for væske. Bytt ut posen for brukte spisser om nødvendig.
5. Last inn elusjonsstativet som skal brukes, i skuffen "Eluate" (Eluat).

**Viktig:** Ikke last inn en plate med 96 brønner i "Elution slot 4" (Elusjonsspor 4).

Bruk kun "Elution slot 1" (Elusjonsspor 1) med tilhørende kjøleadapter.

**Merk:** Ved bruk av en plate med 96 brønner må du påse at platen står riktig vei, ettersom feil plassering kan føre til forveksling av prøver i nedstrømsanalyser.

6. Last inn de(n) nødvendige reagenskassetten(e) og forbruksmaterialene i skuffen "Reagents and Consumables" (Reagenser og forbruksmaterialer).

**Merk:** Kontroller at pipettespissene er riktig festet.

7. Utfør en skanning av beholdningen i skuffen "Reagents and Consumables" (Reagenser og forbruksmaterialer).



8. Overfør **300 µl** av fullblodsprøven som skal ekstraheres, til et nukleasefritt mikrorør (2,0 ml, type H), og sett røret i 3b 2 ml-adapteren på prøverørholderen. Last inn prøverørene i skuffen "Sample" (Prøve).
9. Bruk berøringsskjermen og legg inn opplysningene som kreves for hvert parti med prøver som skal behandles:
  - **Prøveinformasjon:** Endre standard rørformat. Gjør dette ved å klikke på **Select All** (Velg alle). Velg deretter **Sarstedt-referanse 72.694** fra arket **Tube Insert** (Rørrinnlegg).

- **Protokoll som skal kjøres:** Klikk på **Select All** (Velg alle). I kategorien klikker du deretter på **DNA Blood** (DNA-blod) > **Blood\_200\_V7\_DSP** (eller nyere versjon) for fullblodsprøve.



- **Elusjonsvolum og utgangsposisjon:** 100 µl for fullblodprotokollen.  
**Merk:** Etter at du har lagt inn partiinformasjon, endres statusen fra **LOADED** (LASTET) til **QUEUED** (I KØ). Så snart et parti er satt i kø, aktiveres knappen **Run** (Kjør).

## 10. Start kjøringen.

10a. Start kjøringen ved å klikke på **Run** (Kjør).

10b. Les og bekreft meldingen som vises.

**Merk:** Vi anbefaler at du venter ved siden av instrumentet til det har utført detektering av væskenivået i de interne kontrollrørene og fremdriftsstatusen på QIASymphony SP endres til **RUNNING** (KJØRER).

**Viktig:** Du må ikke stoppe eller sette kjøringen på pause under behandlingen (med mindre det oppstår en nødssituasjon), fordi det vil føre til at prøvene flagges som "uklare".

**Merk:** Det er mulig å laste inn prøver fortløpende og legge dem til i denne kjøringen (til reagensene er lastet inn).

## 11. Klikk på **Run** (Kjør) for å starte rensingsprosedyren.

## 12. Mot slutten av kjøringen av protokollen endres statusen for partiet fra **RUNNING** (KJØRER) til **COMPLETED** (FULLFØRT). Ta ut elusjonsstativet med de rensede nukleinsyrene fra skuffen "Eluate" (Eluat).

Vi anbefaler at elueringsplaten fjernes fra skuffen "Eluate" umiddelbart etter at kjøringen er ferdig. Avhengig av temperatur og fuktighet kan elueringsplater som blir værende i QIASymphony SP etter at kjøringen er fullført, bli utsatt for kondens eller fordampning.

**Merk:** Generelt overføres ikke magnetpartikler til eluater. Hvis et eluat inneholder svarte partikler, kan magnetpartiklene fjernes på følgende måte:

12a. Hvis DNA-et er i rør, bruk en egnet magnetseparator (f.eks. QIAGEN 12-Tube Magnet, kat.nr. 36912) til magnetpartiklene er separert.

- 12b. Hvis DNA er i mikroplater, sett mikroplaten i en egnet magnetseparator (f.eks. QIAGEN 96-Well Magnet Type A, kat.nr. 36915) til magnetpartiklene er separert. Hvis du ikke har en egnet magnetseparator tilgjengelig, sentrifuger røret med DNA-et i 1 minutt ved full hastighet i en mikrosentrifuge for å pelletere gjenværende magnetpartikler.
13. Eksporter resultatfilen fra QIASymphony SP: Denne rapporten genereres for hver elueringsplate.
- 13a. Sett inn USB-enheten i USB-porten foran på QIASymphony SP.
- 13b. Klikk på **Tools** (Verktøy).
- 13c. Velg **File Transfer** (Filoverføring).
- 13d. I fanen In-/Output Files (Inn-/utgående filer) klikker du på **Results Files** (Resultatfiler) > **Transfer** (Overfør).  
Navnet på den eksporterte filen skal ha følgende format:  
**yyyy-mm-ddhh:mm:ss\_Elution rack ID (åååå-mm-ddtt:mm:ss\_elusjonsstativ-ID)**
14. Kontroller kolonnen "Validity of result" (Resultatets gyldighet) for hver prøve i QIASymphony SP-resultatfilen.
- **Gyldig og uklar status:** Fortsett til Kvalifisering og kvantifisering av DNA.
  - **Ugyldig status:** Prøven er avvist. Kjør ekstraksjonstrinnet på nytt.
15. Hvis en reagenskasset bare er delvis brukt, forsegler du den med de medfølgende gjenbrukbare tetningsstripsene og lukker rørene som inneholder proteinase K, med skrulokk umiddelbart etter endt protokollkjøring for å unngå fordamping.
16. Kast brukte prøverør, plater og avfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.
17. Rengjør QIASymphony SP.  
Følg vedlikeholdsinstruksjonene i brukerhåndbøkene som følger med instrumentet. Vær nøye med å rengjøre spissbeskyttelsene regelmessig for å redusere faren for krysskontaminering.
18. Lukk instrumentskuffene, og slå av QIASymphony SP.

## Kvalifisering og kvantifisering av DNA

En blank med ATE- eller AE-buffer må brukes for å kalibrere spektrofotometeret. Det er nødvendig å bruke disse bufferne, ettersom elueringsbufferne som brukes i genomisk DNA-ekstraksjonssettene, inneholder konserveringsmiddelet natriumazid, som absorberes ved 260 nm.

- Forholdet  $A_{260}/A_{280}$  må være  $\geq 1,7$ , ettersom mindre forhold vanligvis indikerer proteinkontaminering eller forekomst av organiske kjemikalier og påvirker PCR-trinnet.
- DNA-kvantiitet bestemmes ved å måle optisk tetthet ved 260 nm.
- Total mengde rensed DNA = konsentrasjon x prøvevolum i  $\mu\text{l}$ .
- Hvis forholdet  $A_{260}/A_{280}$  er under 1,7 og/eller hvis genomisk DNA-konsentrasjon er under 10 ng/ $\mu\text{l}$ , må ikke prøven behandles videre.

## Genomisk DNA-prøvenormalisering

DNA-et må fortynnes til 10 ng/ $\mu\text{l}$  med TE-buffere som følger med i *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Hver PCR-reaksjon på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM er optimalisert for 50 ng rensed genomisk DNA fortynnet i et endelig prøvevolum på 5  $\mu\text{l}$ . Totalt 100 ng per testet prøve trengs for å utføre mutant- og villtypereaksjoner.

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

## Viktige punkter før du starter

- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit må kjøres på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit krever den spesifikke Gamma Plug-in. Denne plug-in-en kan lastes ned fra QIAGENs nettside: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Gamma Plug-in må installeres på en datamaskin som allerede har Rotor-Gene AssayManager v2.1 installert.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit krever også en analyseprofil. Denne analyseprofilen (**.iap**-fil) inneholder alle nødvendige parametere for sykluser og analysering av qPCR-analysen. Den kan lastes ned fra nettsiden som er dedikert til *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit på QIAGENs nettside: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Analyseprofilen må importeres til programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- Det er viktig at du gjør deg godt kjent med Rotor-Gene Q MDx-instrumentet før du starter protokollen. Se brukerhåndbøkene for instrumentet, Rotor-Gene AssayManager v2.1 og Gamma Plug-in for mer informasjon.
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 muliggjør automatisert tolkning av PCR-resultatene. Syklusparametrene er låst for kjøringen.

## Oppsett

- Last ned og installer Rotor-Gene AssayManager v2.1. Se "Installasjon av Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneprogramvaren", side 38 for detaljert informasjon.
- Last ned og installer Gamma plug-in. Se "Installasjon av Gamma Plug-in og import av analyseprofil", side 38 for detaljert informasjon.

- Vi anbefaler at du tester åtte genomisk DNA-prøver i samme forsøk for å optimere bruken av kontroller, standarder og reaksjonsblandinger. Se "Prøvebehandling på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor for 72 rør", side 42 for detaljert informasjon.

## Installasjon av Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneprogramvaren

Rotor-Gene AssayManager v2.1-programvaren må være installert på datamaskinen som er koblet til Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet, og kan lastes ned fra QIAGENs nettside: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). For detaljert informasjon om installasjon av Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneprogramvaren, inkludert krav til datamaskinen, kan du se *brugerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

**Merk:** *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit kan kun kjøres når visse konfigurasjonsinnstillinger i Rotor-Gene AssayManager v2.1-programvaren er programmert.

For sikkerhet gjennom hele systemet må følgende nødvendige konfigurasjonsinnstillinger være definert for lukket modus:

- Material number required (Krever materialnummer)
- Valid expiry date required (Krever gyldig utløpsdato)
- Lot number required (Krever lotnummer)

## Installasjon av Gamma Plug-in og import av analyseprofil

Installasjon og import av Gamma Plug-in og analyseprofilen er beskrevet i *brugerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneapplikasjonen (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual)* og i *brugerhåndboken for Gamma Plug-in (Gamma Plug-in User Manual)*.

## Installere Gamma Plug-in

1. Last ned både Gamma Plug-in og den nyeste versjonen av *ipsogen* JAK2 CE IVDR-analyseprofilen fra QIAGENs nettside.
2. Dobbeltklikk på .msi-filen **RGAM\_V2\_1\_Gamma\_Plug-in.Installation.V1\_0\_x** (der  $x \geq 0$ ). Følg installasjonsinstruksjonene.


For en detaljert beskrivelse av denne prosessen kan du se delen "Installere Plug-in-er" i *brugerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

**Merk:** Av systemsikkerhetshensyn klikker du på fanen Settings (Innstillinger) og merker av i boksene for **Material number required** (Krever materialnummer), **Valid expiry date required** (Krever gyldig utløpsdato) og **Lot number required** (Krever lotnummer) for lukket modus (delen Work list (Arbeidsliste)). Hvis de ikke er aktivert (merket av), klikker du for å aktivere dem.

3. Når plug-in-en er installert, må en bruker med administratorrettigheter for programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1 importere *ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR*-analyseprofilen.

## Importere *ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR*-analyseprofilen



1. Klikk på ikonet  for Rotor-Gene AssayManager v2.1 for å åpne programvaren.
2. Logg på som bruker med administratorrettigheter i lukket modus (Figur 3). Påloggingsvinduet åpnes (Figur 4).



## Rotor-Gene AssayManager

2.1.0.7

User ID

Password

Mode  
Closed

OK Cancel

Figur 3. Påloggingsvindu for Rotor-Gene AssayManager. 1: Closed mode (Lukket modus).

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	20/10/2020 17:09:42	[Icons]	[Apply]

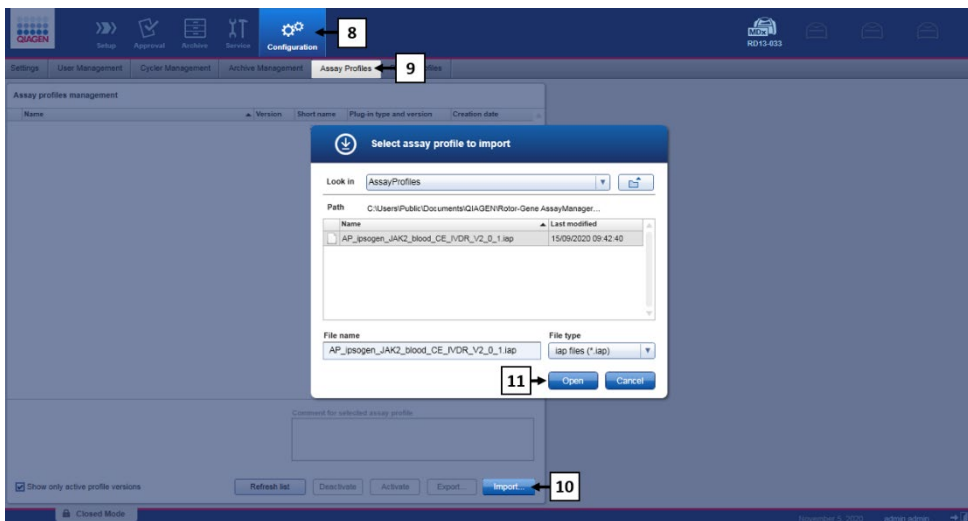
Figur 4. Rotor-Gene AssayManager v.2.1.1. 2: Miljøet Setup (Oppsett). Brukes til å opprette, administrere og bruke arbeidslister. 3: Miljøet Approval (Godkjenning). Brukes til å søke etter ikke frigitte eller delvis frigitte forsøk og til å godkjenne dedikerte prøver. Eksperimentrapporter opprettes når en prøve frigis. 4: Miljøet Archive (Arkiv). Brukes til å søke etter fullstendige og delvis frigitte eksperimenter og til å generere eksperimentrapporter ved hjelp av forhåndsdefinerte rapportprofiler. 5: Miljøet Service (Service). Inneholder fanene Audit Trail (Revisjonssporing) og Re-usable Data (Gjenbrukbare data). 6: Configuration (Konfigurasjon). Brukes til å justere innstillingene for Rotor-Gene AssayManager. 7: Rotor-Gene Q-ikon. Brukes til å stoppe eller fullføre en kjøring og til å frigi en sentrifuge når en kjøring er fullført (og for å kontrollere instrumenttilkobling).

3. Klikk på Configuration (Konfigurasjon) (Figur 4, boks 6) (Figur 5, boks 8).

4. Klikk på fanen Assay Profiles (Analyseprofiler) (Figur 5, boks 9).



5. Klikk på **Import** (Importer) (Figur 5, boks 10).
6. I dialogboksen Select assay profile to import (Velg analyseprofil som skal importeres) velger du ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR-analyseprofilen. Klikk på **Open** (Åpne) (Figur 5, boks 11).



**Figur 5. Import av analyseprofil.** 8: Miljøet Configuration (Konfigurasjon), 9: Fanen Assay profile (Analyseprofil), 10: Knappen Import (Importer), 11: Knappen Open (Åpne).

7. Etter at analyseprofilen er importert, kan den brukes i miljøet Setup (Oppsett) (Figur 4, boks 2).

**Merk:** Samme versjon av en analyseprofil kan ikke importeres to ganger.

## Prøvebehandling på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor for 72 rør

Vi anbefaler at du tester åtte genomisk DNA-prøver i samme forsøk for å optimere bruken av kontroller, standarder og reaksjonsblandinger.

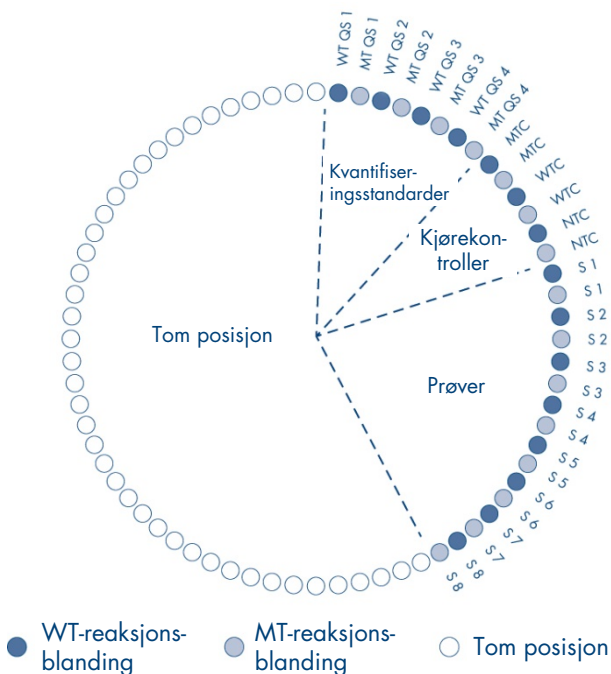
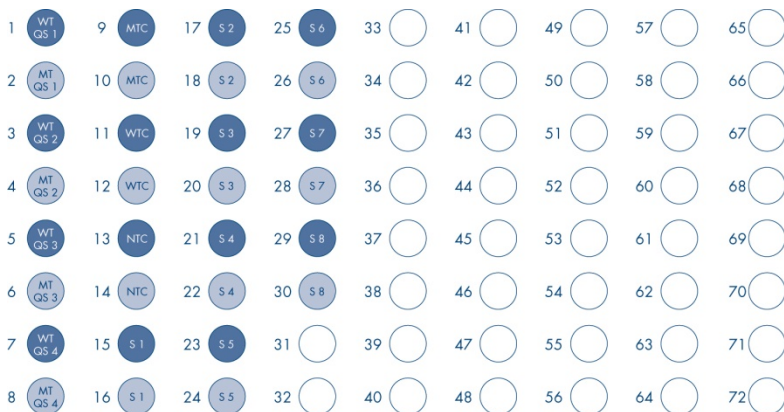
Tabell 3 angir hvor mange reaksjoner som kan kjøres med rotoren for 72 rør.

Skjemaet som vises i Figur 6, er et eksempel på oppsett av lasteblokken og rotoren for et forsøk med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Tallene angir posisjoner i lasteblokken og indikerer endelig rotorposisjon.

**Tabell 3. Antall reaksjoner for Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor for 72 rør**

Prøver	Antall reaksjoner
<b>Med JAK2 MT-reaksjonsblanding</b>	
8 genomisk DNA-prøver	8
JAK2 MT-kvantifiseringsstandarder (mutant)	4
JAK2 MT-kontroll (mutant)	1
JAK2 WT-kontroll (villtype)	1
Vann til ikke-templatkontroll (NTC)	1
<b>Med JAK2 WT-reaksjonsblanding</b>	
8 genomisk DNA-prøver	8
JAK2 WT-kvantifiseringsstandarder (villtype)	4
JAK2 MT-kontroll (mutant)	1
JAK2 WT-kontroll (villtype)	1
Vann til NTC	1



**Figur 6. Plate- og rotoroppsett for et forsøk med ipsogen JAK2 RGGQ PCR Kit.** WTC: JAK2 WT-kontroll; MTC: JAK2-mutantkontroll (MT); WT-QS: JAK2 WT-kvantifiseringsstandarder; MT-QS: JAK2 MT-kvantifiseringsstandarder; S: genomisk DNA-prøve; NTC: ikke-templatkontroll (vann).



Rør må settes inn i rotoren som er angitt i Figur 6, ettersom den automatiserte analysen definert i analyseprofilen er basert på dette oppsettet. Hvis det brukes et annet oppsett, vil resultatene bli feil.

**Merk:** Alle ubrukte posisjoner skal fylles med tomme lukkede remserør.

# qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med rotor for 72 rør

Ting du skal gjøre før du starter:

- Opprett en arbeidsliste for prøvene som skal behandles.

## Opprette en arbeidsliste

1. Slå på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
2. Åpne Rotor-Gene AssayManager v2.1-programvaren, og logg på som bruker med rollen operatør i lukket modus (Figur 3, boks 1).
3. Kontroller at Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet er riktig detektert av programvaren før du starter kjøringen (Figur 7).



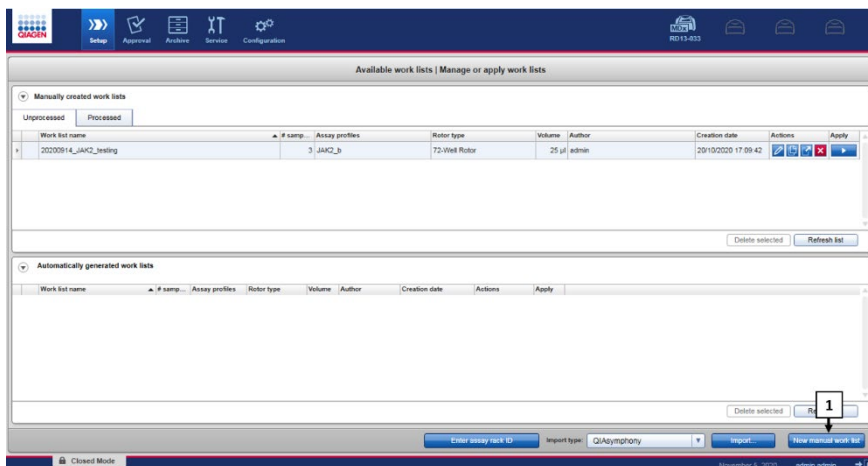
Ikke koblet til



Koblet til

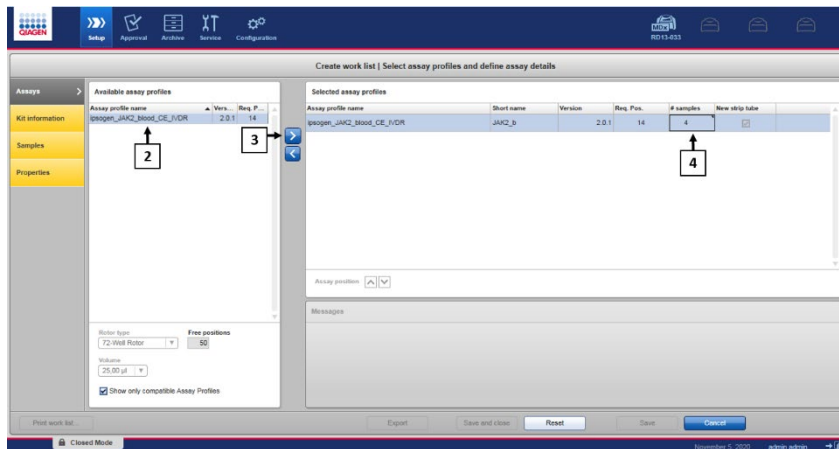
Figur 7. Tilkoblingsstatus for Rotor-Gene Q.

4. Klikk på **"New manual work list"** (Ny manuell arbeidsliste) i miljøet Setup (Oppsett) (Figur 8, boks 1).



Figur 8. Opprette arbeidsliste. 1: Knapp for å opprette ny arbeidsliste.

5. Velg "ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR"-analyseprofilen fra listen over tilgjengelige analyseprofiler i trinnet "Assay" (Analyse) (Figur 9, boks 2).



**Figur 9. Opprette arbeidsliste – valg av analyseprofil.** 2: Tilgjengelige analyseprofiler. 3: Analyseprofiloverføring til arbeidsliste. 4: Angi antall prøver.

6. Klikk på ">" for å overføre den valgte analyseprofilen til listen "**Selected assay profiles**" (Valgte analyseprofiler) (Figur 9, boks 3). Analyseprofilen skal nå vises i listen "**Selected assay profiles**" (Valgte analyseprofiler).
7. Angi antall prøver i tilhørende felt (Figur 9, boks 4).
8. Klikk på trinnet "Kit Information" (Informasjon om settet), og legg inn følgende informasjon om JAK2-settet manuelt, som er trykt på lokket til esken:
- Materialnummer 1120216 (Figur 10, boks 6)
  - Gyldig utløpsdato (Figur 10, boks 7)
  - Lotnummer (Figur 10, boks 8)

**Merk:** Alternativt kan strekkoden for settet (Figur 10, boks 5) angis eller skannes.

**Merk:** Alle felter må fylles ut. Felter blir blå når gyldig informasjon er angitt (dvs. sett er ikke utløpt, gyldig material- og lotnummer er angitt).

**Figur 10. Opprette arbeidsliste – angi informasjon om sett.** 5: Strekkode for settet (kan skannes eller angis manuelt; hvis strekkoden angis, fylles de andre feltene ut automatisk). 6: Materialnummer. 7: Utløpsdato for settet. 8: Lotnummer. Denne informasjonen er tilgjengelig på esken til settet.

9. Klikk på trinnet "Samples" (Prøver).

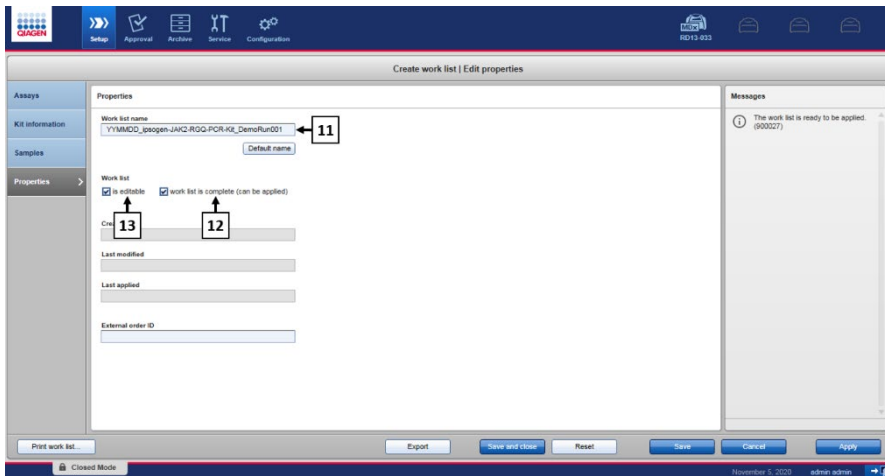
En liste med detaljer om prøvene vises. Denne listen representerer det forventede oppsettet for rotoren.

10. Legg inn prøveidentifikasjonsnumre (ID) (Figur 11, boks 9) i listen og eventuelt valgfri prøveinformasjon (Figur 11, boks 10) som en kommentar for hver prøve.

Pos.	Style	Sample ID	Status	Sample type	Targets	Assay	Sample comment
2					FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	
3		OS2		OS	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
4		OS3		OS	FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	
5		OS3		OS	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
6		OS4		OS	FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	
7		OS4		OS	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
8		MutantControl		PC	FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	
9		MutantControl		PC	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
10		WBTypeControl		PC	FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	
11		WBTypeControl		PC	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
12		NTC		NTC	FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	
13		NTC		NTC	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
14		Sample 1		Test	FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	
15		Sample 1		Test	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
16		Sample 2		Test	FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	
17		Sample 2		Test	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
18		Sample 3		Test	FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	
19		Sample 3		Test	FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
20					FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	
21					FAM_WT_HEX_WT	JAK2_b	
22					FAM_MIT_HEX_MIT	JAK2_b	

**Figur 11. Opprette arbeidsliste – angi prøveinformasjon.** 9: Prøve-ID. 10: Prøvekommentarer (valgfritt)

11. Klikk på trinnet "Properties" (Egenskaper). Angi et arbeidslistenavn (Figur 12, boks 11).
12. Merk av i boksen "**work list is complete (can be applied)**" (arbeidsliste er fullført (kan brukes)) (Figur 12, boks 12).



**Figur 12. Opprette arbeidsliste – egenskaper.** 11: Arbeidslistenavn. 12: Merk av for alternativet "work list is complete" (arbeidsliste er fullført). 13: Fjern merkingen i boksen for "is editable" (kan redigeres) kun hvis arbeidslisten ikke skal endres.

**Merk:** Avkrysningsboksen "**is editable**" (kan redigeres) (Figur 12, boks 13) definerer hvorvidt arbeidslisten fortsatt kan redigeres eller ikke. Hvis arbeidslisten gjelder og ikke skal endres senere, fjerner du merket i avkrysningsboksen **is editable** (kan redigeres).

13. Lagre arbeidslisten.
14. Arbeidslisten kan skrives ut for å gjøre det enklere å klargjøre og sette opp qPCR. Klikk på "**Print work list**" (Skriv ut arbeidsliste) for å skrive ut arbeidslisten. Prøveinformasjon er inkludert som en del av arbeidslisten.

**Merk:** Arbeidslisten kan lagres og kjøres senere eller kan opprettes ved lastning av forsøket i instrumentet og brukes direkte.



## Prosedyre

### Sette opp qPCR-forsøket

1. Tin alle nødvendige komponenter bortsett fra *Taq* DNA-polymerasen, som må oppbevares i fryseren når den ikke er i bruk. Legg rørene som inneholder komponentene som skal tines, på is.

**Viktig:** Sørg for at opptiningstrinnet ikke overstiger 30 minutter, for å unngå degradering av materiale.

2. Rengjør benkeområdet dedikert for klargjøring av PCR-blandingen for å unngå templat- eller nukleasekontaminering.
3. Bland forsiktig rør som inneholder standarder, kontroller og reaksjonsblandinger, ved å vende dem 10 ganger, og sentrifuger dem kort før bruk.
4. Klargjør følgende qPCR-masterblandinger i henhold til antall prøver som skal behandles.

**Merk:** Alle konsentrasjoner er angitt for det endelige reaksjonsvolumet.

Tabell 4 og Tabell 5 beskriver pipetteringsskjemaet for klargjøring av én MT- og én WT-reagensblanding, beregnet for å oppnå endelige reaksjonsvolumer på 25 µl. Ekstra volum er inkludert for å kompensere for pipetteringsfeil og for å kunne klargjøre for 8 prøver pluss kontroller.

**Tabell 4. Klargjøring av qPCR-masterblandinger for påvisning av JAK2 MT-sekvens**

Komponent	1 reaksjon (µl)	15 + 1* reaksjoner (µl)	Sluttkonsentrasjon
JAK2 MT reaksjonsblanding	19,8	316,8	1x
<i>Taq</i> DNA-polymerase	0,2	3,2	1x
Prøve (som skal tilsettes i trinn 6)	5	5 hver	–
Totalt volum	25	25 hver	–

\* Ekstra reaksjonsvolum er inkludert som dødvolum.

Tabell 5. Klargjøring av qPCR-masterblandinger for påvisning av JAK2 WT-sekvens

Komponent	1 reaksjon (µl)	15 + 1* reaksjoner (µl)	Sluttkonsentrasjon
JAK2 WT reaksjonsblanding	19,8	316,8	1x
Taq DNA-polymerase	0,2	3,2	1x
Prøve (som skal tilsettes i trinn 6)	5	5 hver	–
Totalt volum	25	25 hver	–

\* Ekstra reaksjonsvolum er inkludert som dødvolum.

**Viktig: Vorteksbland og sentrifuger kort** qPCR-masterblanding før 20 µl dispenseres i hvert remserør.

5. Tilsett vannet for ikke-templatkontroll (No Template Control, NTC) i tilsvarende rør, og lukk dem.

6. **Viktig: Vorteksbland og sentrifuger kort** DNA (genomisk DNA-prøver pluss QS og kontroller). Tilsett deretter 5 µl materiale som skal kvantifiseres, i tilhørende remserør, slik at det blir et totalt volum på 25 µl. Bland forsiktig ved å pipettere opp og ned.

**Merk:** Vær nøye med å bytte spisser mellom hvert rør for å unngå falskt positive resultater som følge av kontaminering med uspesifikt templat eller reaksjonsblanding. Begynn med å legge til testprøvene og deretter standardene og kontrollene.

7. Sett alle komponentene i *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit tilbake i fryseren for å unngå degradering av materialer.

## Starte kjøringen

1. Klargjør Rotor-Gene Q MDx, og start kjøringen som følger.
  - 1a. Sett en rotor med 72 brønner inn i rotorholderen på Rotor-Gene Q MDx.
  - 1b. Fyll rotoren med remserør i henhold til tildelte posisjoner. Start med posisjon 1, som vist i Figur 6 (side 43), med tomme lukkede remserør plassert i alle ubrukte posisjoner.

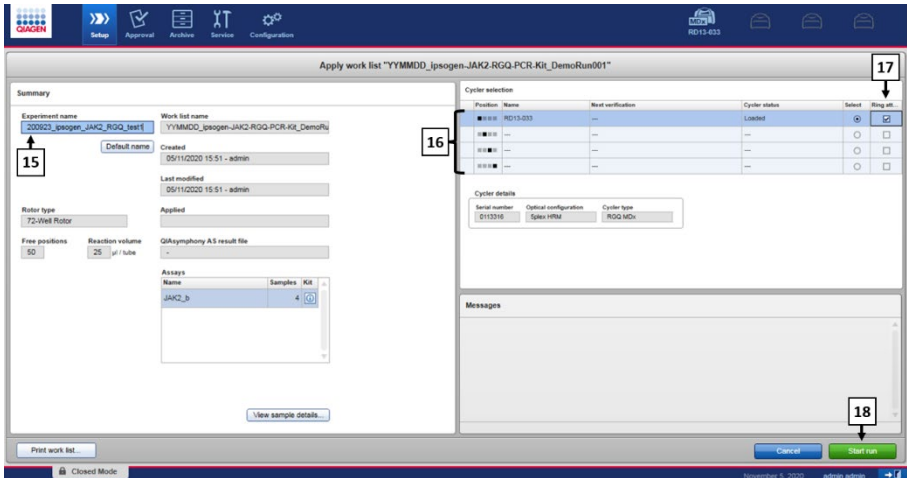
**Merk:** Forsikre deg om at det første røret er satt inn i posisjon 1, og at remserørene er plassert i riktig retning og posisjon, som vist i Figur 6.
  - 1c. Fest låseringen.
  - 1d. Sett inn rotoren og låseringen i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og lukk instrumentlokket.
  - 1e. I Rotor-Gene AssayManager v2.1-programvaren velger du den tilhørende arbeidslisten fra arbeidslisteadministratoren og klikker på **"Apply"** (Bruk) (Figur 13, boks 14). Hvis arbeidslisten fortsatt er åpen, klikker du på **"Apply"** (Bruk).



Figur 13. Kjøringsoppsett – valg av arbeidsliste. 14: Knappen Apply (Bruk).

**Merk:** Hvis arbeidslisten for forsøket ikke er opprettet, logger du på Rotor-Gene AssayManager v2.1 og følger prosessen i "Opprette en arbeidsliste", side 45 før du fortsetter som beskrevet nedenfor.

- Angi forsøksnavnet (Figur 14, boks 15).
- Velg sentrifugen som skal brukes, i **"Cycler selection"** (Sentrifugevalg) (Figur 14, boks 16). "
- Kontroller at låseringen er satt på riktig, og bekreft på skjermen at låseringen er festet (Figur 14, boks 17).
- Klikk på **"Start run"** (Start kjøring) (Figur 14, boks 18).



**Figur 14. Kjøringsoppsett – kjøringssinnstillinger.** 15: Forsøksnavn. 16: Sentrifugevalg. 17: Kontroller og bekreft at låseringen er festet. 18: Knappen Start run (Start kjøring).

1f. JAK2 RGQ PCR-kjøringen skal nå starte.

## Avslutte, frigi og godkjenne kjøringen

1. Når kjøringen er ferdig, klikker du på **"Finish run"** (Fullfør kjøring).

**Merk:** Forsøket lagres ikke i den interne databasen før dette trinnet er fullført.

**Merk:** Analysen av de innhentede dataene utføres automatisk avhengig av om plug-in-en korresponderer med analyseprofilen og reglene og parameterverdiene definert i analyseprofilen.

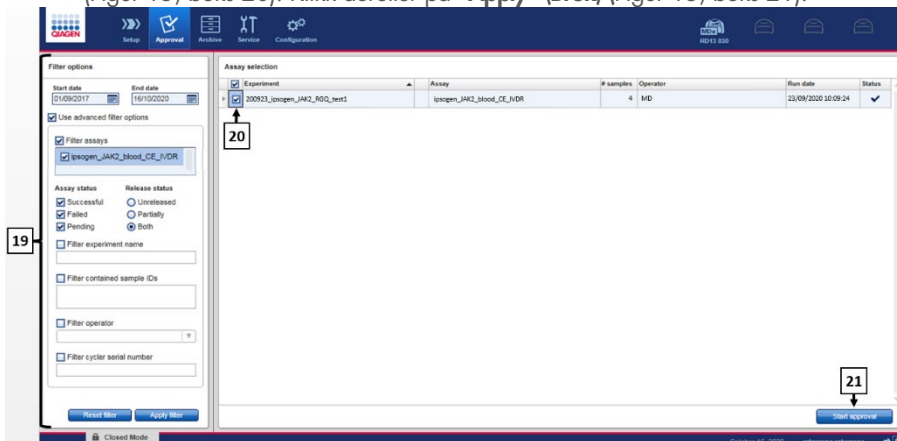
2. Frigi og godkjenne kjøringen.

- Brukere som er logget inn med rollen Approver (Godkjenner), kan klikke på **"Release and go to approval"** (Frigi og gå til godkjenning).
- Brukere som er logget inn med rollen Operator (Operatør), kan klikke på **"Release"** (Frigi).

**Merk:** Den generelle funksjonaliteten i miljøet "Approval" (Godkjenning) er beskrevet i brukerhåndboken for Gamma Plug-in for Rotor-Gene AssayManager v2.1.

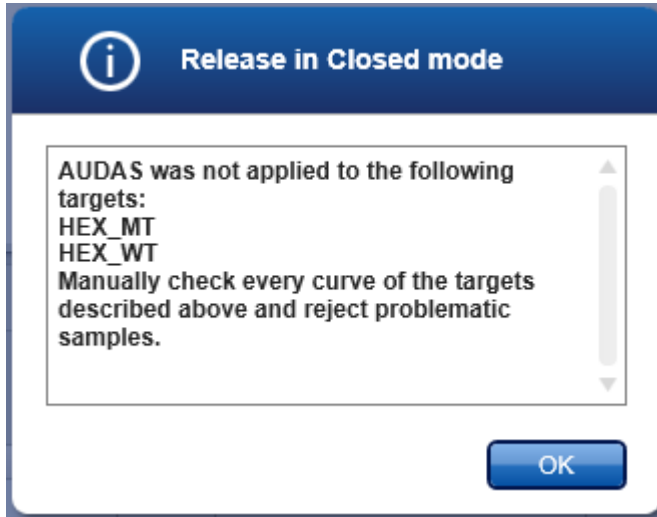
### 3. Frigi resultater.

- Hvis du klikket på "**Release and go to approval**" (Frigi og gå til godkjenning), vises resultatene for forsøket i miljøet "Approval" (Godkjenning).
- Hvis du klikket på "**Release**" (Frigi), må en bruker med rollen "Approver" (Godkjenner) logge seg inn og velge miljøet "Approval" (Godkjenning).
- Bruk filteralternativene (Figur 15, boks 19) for å velge forsøket som skal godkjennes (Figur 15, boks 20). Klikk deretter på "**Apply**" (Bruk) (Figur 15, boks 21).



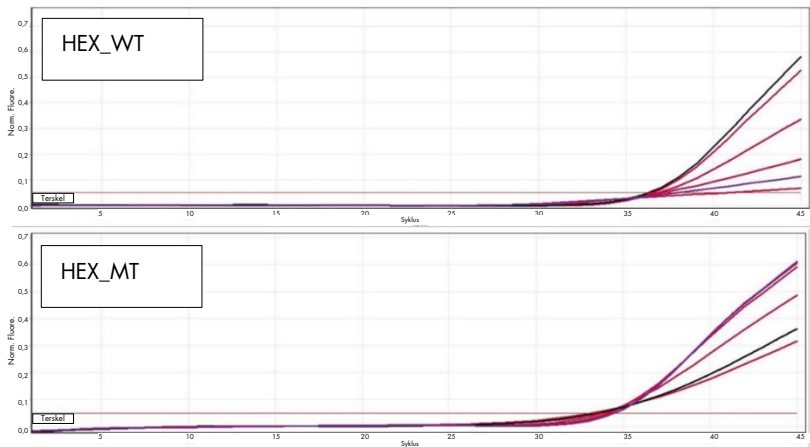
**Figur 15. Kjøringsgodkjenning – valg av forsøk.** 19: Filteralternativer. 20: Analysevalg. 21: Knappen Start approval (Start godkjenning).

- Følgende AUDAS-varsel (Automatic Data Scan (Automatisk dataskanning)) vises (Figur 16). I delen "Plots and Information" (Diagrammer og informasjon) kontrollerer du manuelt fluorescenskurvene for HEX-målene for anomalier (f.eks. topper forårsaket av maskinvarefeil).



Figur 16. AUDAS-varsel.

**Merk:** Kurvene til den interne kontrollens HEX-mål viser ikke typiske sigmoide former (som i eksempelkurvene i Figur 17) og må anses som gyldige kurver. Vær oppmerksom på at alle andre gyldighetskriterier for intern kontroll (f.eks.  $C_T$ -cutoff-er) kontrolleres automatisk av programvaren.



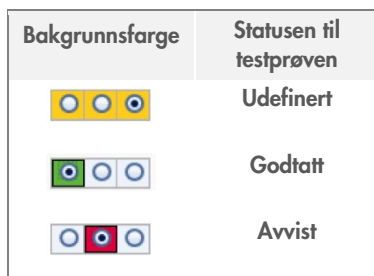
Figur 17. HEX-kurver for intern kontroll.

Resultatene fra testprøvene blir automatisk analysert av Rotor-Gene AssayManager v2.1, men må godkjennes og frigis av en bruker som er logget inn med rollen som godkjenner. Først har alle testprøver for et fullført forsøk statusen "Undefined" (Udefinert). Resultatene av prøvene som skal godkjennes, har tre godkjenningsknapper i enden av den dedikerte raden. Disse knappene brukes til å interaktivt godta eller avvise prøveresultatene (Figur 18 og Figur 19).

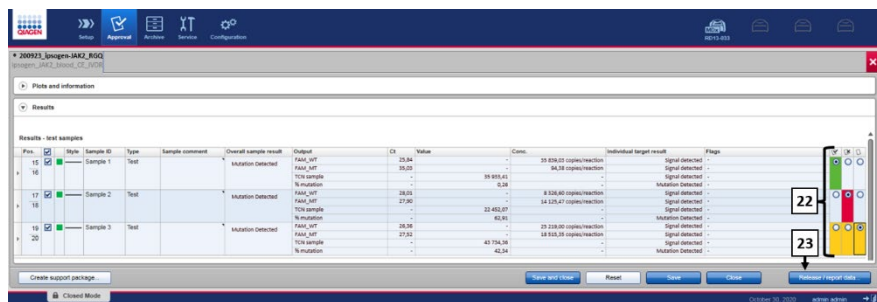
**Merk:** En prøve som rapporteres som "INVALID" (Ugyldig) av Rotor-Gene AssayManager v2.1, kan ikke tilordnes på nytt som "VALID" (Gyldig) selv om prøveresultatet blir avvist.

**Merk:** En prøve skal avvises hvis brukeren ikke er enig i resultatet og ønsker å teste på nytt (f.eks. hvis anomali observeres på kurvene til HEX-målene for intern kontroll).

- Gjennomgå resultat (Figur 19, boks 22), og klikk på "Release/Report data" (Frigi/rapporter data) (Figur 19, boks 23).



Figur 18. Statusdefinisjon for prøvegodkjenning.



Figur 19. Frigi og rapporter data. 22: Knapper for godkjenning av prøver (for å godkjenne (✓) eller avvise (✗) resultater for hver prøve). 23: Knappen Release and report data (Frigi og rapporter data).

- Angi om nødvendig passord, merk av i boksen "**Create report**" (Opprett rapport), og klikk på "**OK**" (Figur 20, boks 24 og 25). Rapporten vil bli opprettet i .pdf-format og lagres automatisk i den forhåndsdefinerte mappen.

Standard mappebane er:

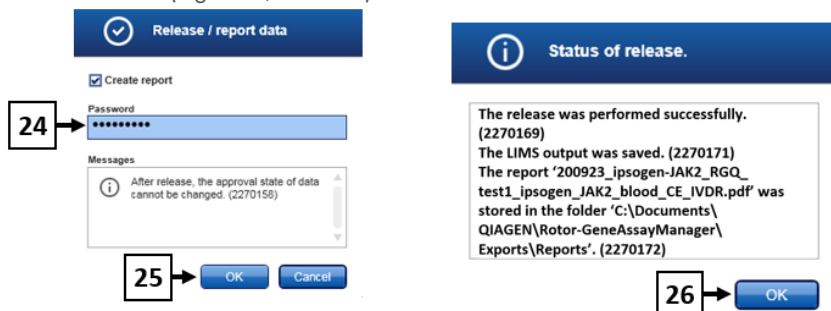
**C: > Users (Brukere) > Public (Offentlig) > Documents (Dokumenter) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Eksport) > Reports (Rapporter)**

**Merk:** Denne banen og mappen kan endres i miljøet Configuration (Konfigurasjon).

- Samtidig opprettes og lagres det en LIMS-fil i den forhåndsdefinerte mappen automatisk. Standard mappebane er: **C: > Users (Brukere) > Public (Offentlig) > Documents (Dokumenter) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Eksport) > LIMS.**

**Merk:** Denne banen og mappen kan endres i miljøet "Configuration" (Konfigurasjon).

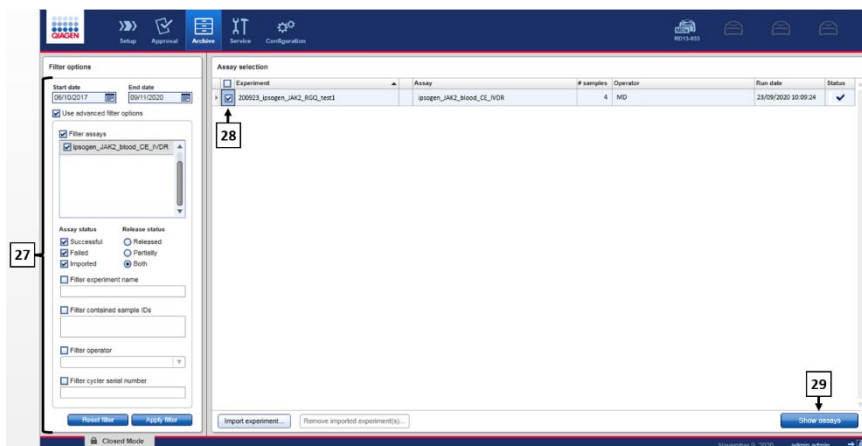
- Lukk pdf-filen, og gå tilbake til Rotor-Gene AssayManager. Klikk på "**OK**" når du blir bedt om det (Figur 20, boks 26).



**Figur 20. Frigi og rapporter data.** 24: Brukerpassord. 25–26: OK-knapp for å velge.

- En PDF-rapport genereres og åpnes når et brukerpasord angis. Lukk PDF-rapporten. En LIMS-fil genereres deretter automatisk, og en melding om frigivelse vises. Klikk på "**OK**". Analysen er nå helt frigitt. Klikk på "**OK**" for å gå til miljøet "Archive" (Arkiv).
- Klikk på fanen Archive (Arkiv) for å eksportere .rex-filen, tilsvarende rådataene. Finn forsøket ved hjelp av filteralternativene (Figur 21, boks 27 og 28), og klikk på "**Show assays**" (Vis analyser) (Figur 21, boks 29).





Figur 21. Miljøet Archive (Arkiv). 27: Filteralternativer. 28: Analysevalg. 29: Knappen Show assays (Vis analyser).

- Forsøksresultater vises. I nederste høyre hjørne av skjermen velger du ".**rex-file**" (.rex-fil) som type fil som skal eksporteres. Klikk på "**Export**" (Eksporter). Klikk på "**OK**" for å lagre. Programvaren lagrer .rex-filen automatisk i følgende forhåndsdefinerte mappe: **C: > Users (Brukere) > Public (Offentlig) > Documents (Dokumenter) > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Experiments (Forsøk)**. **Merk:** Denne banen og mappen kan endres i fanen "Specify the .rex file export destination" (Angi mål for .rex-fileksport). **Merk:** Ved feilsøking kan det være behov for en støttepakke fra kjøringen. Støttepakker kan genereres fra miljøene Approval (Godkjenning) eller Archive (Arkiv) ("Creating a support package" (Opprette en støttepakke) i delen "Troubleshooting" (Feilsøking) i *brugerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*). I tillegg kan et revisjonsspor fra  $\pm 1$  dag fra tidspunktet for hendelsen være nyttig. Revisjonssporing kan hentes fra miljøet Service (Service) (se *brugerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*, punkt 1.5.5.5).

4. Tøm Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og kast remserørene i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

# Tolkning av resultater

Analysen er helautomatisert.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyserer først\* amplifikasjonskurver, og kan ugyldiggjøre feilaktige kurver, avhengig av form og støyamplitude. Hvis dette er tilfellet, vil et flagg bli knyttet til den ugyldige kurven.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 vil deretter analysere kjørek kontrollene:

- NTC: NTC kontrolleres for fravær av spesifikk amplifikasjon (JAK2 WT og JAK2 MT).
- WT og MT QS: Valideringen av kvantifiseringsstandarder er basert på  $R^2$ - og helningsverdiene for hver standardkurve.
- WTC: Det totale JAK2-kopinummeret (Total Copy Number, TCN) må være høyt nok for at denne kontrollen skal bli tolket. Hvis dette er tilfellet, vil JAK2-mutasjonsprosenten bli beregnet. Denne kjørek kontrollen valideres hvis statusen er WT i henhold til testen.
- MTC: Det totale JAK2-kopinummeret må være høyt nok for at denne kontrollen skal bli tolket. Hvis dette er tilfellet, vil JAK2-mutasjonsprosenten bli beregnet. Denne kjørek kontrollen valideres hvis statusen er svært positiv for JAK2-mutasjonen.

Den interne kontrollen må forsterkes i alle brønner som inneholder kontroller og kvantifiseringsstandarder, og må være innenfor det forhåndsdefinerte området for kontroller.

**Merk:** Rapporten som genereres mot slutten av hver kjøring, viser resultatene som ble innhentet for kjørek kontroller. Alle ugyldige data blir tilknyttet med et flagg for ugyldiggjøring (Tabell 6).

Hvis noen av disse kjørek kontrollene ikke samsvarer, brukes flagget "ASSAY\_INVALID". Hvis dette flagget er fremhevet, skal kjøringen bli ansett som ugyldig og forsøket må gjentas.

\* Aktivert kun for FAM-mål.

Hvis alle kontrollene i kjøringen samsvarer, vil Rotor-Gene AssayManager v2.1 analysere testprøvene.

- Den interne kontrollen må forsterkes i alle brønner som inneholder prøver, og må være innenfor det forhåndsdefinerte området.
- Det totale kopinummeret må være høyt nok i en gitt prøve for at resultatene skal bli tolket.
- JAK2-mutasjonsprosenten vil deretter bli beregnet, og resultatet vil bli vist. En CT-verdi må bli observert i hvert rør (WT og MT) for at en prøve skal bli validert av Rotor-Gene AssayManager v2.1, og for at tilhørende resultat skal være gyldig.

**Merk:** Hvis både kjørek kontrollene og prøveresultatene er gyldige, vil rapporten vise kopinummeret og mutasjonsprosenten for hver prøve.

- Tabell 6 viser de ugyldiggjørende prøveflaggene som kan tildeles til et enkelt rør under analysen med Rotor-Gene AssayManager v2.1, sammen med en forklaring på hva flagget betyr.
- Tabell 7 (side 64) viser advarselsprøveflagg og beskrivelse av uttrykk.

**Tabell 6. Ugyldiggjørende prøveflagg og beskrivelse av uttrykk**

Flagg	Beskrivelse
ANALYSIS_FAILED	Analysen er satt til ugyldig fordi analysen har mislyktes. Kontakt QIAGENs tekniske serviceavdeling.
ASSAY_INVALID	Analysen er ugyldig fordi minst én ekstern kontroll er ugyldig.
CONSECUTIVE_FAULT	Et mål som er brukt til beregning av dette målet, er ugyldig.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Amplifikasjonskurven for rådata viser en form som avviker fra det etablerte forløpet til denne analysen. Det er stor sannsynlighet for feil resultater eller feiltolkning av resultater.
FLAT_BUMP	Amplifikasjonskurven for rådata viser en form som en flat hump som avviker fra det etablerte forløpet til denne analysen. Det er stor sannsynlighet for feil resultater eller feiltolkning av resultater (f.eks. feil bestemmelse av $C_T$ -verdi).
INVALID_CALCULATION	Beregning for dette målet mislyktes.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	Den påviste $C_T$ -verdien er høyere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som mutantkontrollen med villtype-reaksjonsblandingen.
MC_IC_LOW_CT (WT)	Den påviste $C_T$ -verdien er lavere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som mutantkontrollen med villtype-reaksjonsblandingen.
MC_IC_NO_CT (MT)	Ingen påviselig $C_T$ for den interne kontrollen i samme rør som mutantkontrollen med mutant-reaksjonsblandingen.
MC_IC_NO_CT (WT)	Ingen påviselig $C_T$ for den interne kontrollen i samme rør som mutantkontrollen med villtype-reaksjonsblandingen.
MC_LOW_CN	Kopinummeret for mutantkontrollen er for lavt.
MC_LOW_PERCENTAGE	Mutasjonsprosenten for mutantkontrollen er for lav.
MC_NO_CN	Ingen kopinummer for mutantkontrollen.
MC_NO_CT (MT)	Ingen påviselig $C_T$ for mutantkontrollen med mutant-reaksjonsblandingen.

Tabellen fortsetter på neste side.

Tabellen fortsetter fra forrige side

**Tabell 6. Ugyldiggjørende prøveflagg og beskrivelse av uttrykk (forts.)**

Flagg	Beskrivelse
MC_NO_VALUE	Mutasjonsprosenten for mutantkontrollen har ingen verdi.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Påvist $C_T$ er lavere enn forventet for mutantkontrollen med mutantreaksjonsblandingen.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Påvist $C_T$ er lavere enn forventet for mutantkontrollen med villtype-reaksjonsblandingen.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Amplifikasjonskurven krysser terskelen mer enn én gang. En utvetydig $C_T$ kan ikke bestemmes.
NO_BASELINE	Ingen innledende baseline er funnet. Den etterfølgende analysen kan ikke utføres.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	Den påviste $C_T$ -verdien er høyere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som ikke-templatkontrollen med mutantreaksjonsblandingen.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	Den påviste $C_T$ -verdien er høyere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som ikke-templatkontrollen med villtype-reaksjonsblandingen.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Ingen påviselig $C_T$ for den interne kontrollen i samme rør som ikke-templatkontrollen med mutantreaksjonsblandingen.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Ingen påviselig $C_T$ for den interne kontrollen i samme rør som ikke-templatkontrollen med villtype-reaksjonsblandingen.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	Den påviste $C_T$ -verdien er lavere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som ikke-templatkontrollen med mutantreaksjonsblandingen.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	Den påviste $C_T$ -verdien er lavere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som ikke-templatkontrollen med villtype-reaksjonsblandingen.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	$C_T$ er påvist i ikke-templatkontrollen.
OTHER_TARGET_INVALID	Et annet mål for samme prøve er ugyldig.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	Den beregnede konsentrasjonen for denne prøven overskrider den tekniske grensen.

Tabellen fortsetter på neste side.

Tabellen fortsetter fra forrige side

**Tabell 6. Ugyldiggjørende prøveflagg og beskrivelse av uttrykk (forts.)**

Flagg	Beskrivelse
QS_HIGH_SLOPE (MT)	Den øvre grensen for mutantheelingen er overskredet.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	Den øvre grensen for villtypeheelingen er overskredet.
QS_IC_NO_CT (MT)	Ingen påviselig $C_T$ for den interne kontrollen i samme rør som én eller flere av mutant-quantifiseringsstandardene.
QS_IC_NO_CT (WT)	Ingen påviselig $C_T$ for den interne kontrollen i samme rør som én eller flere av villtype-quantifiseringsstandardene.
QS_LOW_SLOPE (MT)	Den nedre grensen for mutantheelingen er ikke nådd.
QS_LOW_SLOPE (WT)	Den nedre grensen for villtypeheelingen er ikke nådd.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	Den nedre grensen for mutant- $R^2$ er ikke nådd.
QS_LOW_RSQUARED (WT)	Den nedre grensen for villtype- $R^2$ er ikke nådd.
QS_NO_CT (MT)	Ingen påviselig $C_T$ for én eller flere av mutant-quantifiseringsstandardene.
QS_NO_CT (WT)	Ingen påviselig $C_T$ for én eller flere av villtype-quantifiseringsstandardene.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Påvist $C_T$ er lavere enn forventet for én eller flere av mutant-quantifiseringsstandardene.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Påvist $C_T$ er lavere enn forventet for én eller flere av villtype-quantifiseringsstandardene.
RUN_FAILED	Analysen er satt til ugyldig på grunn av et problem med sentrifugen eller sentrifugeforbindelsen.
RUN_STOPPED	Analysen er satt til ugyldig fordi kjøringen er stoppet manuelt.
SAMPLE_LOW_CN	Det totale kopinummeret for en testprøve er for lavt.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	Den påviste $C_T$ -verdien er høyere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som en testprøve med mutant-reaksjonsblandingen.

Tabellen fortsetter på neste side.

Tabellen fortsetter fra forrige side

**Tabell 6. Ugyldiggjørende prøveflagg og beskrivelse av uttrykk (forts.)**

Flagg	Beskrivelse
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	Den påviste $C_T$ -verdien er lavere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som en testprøve med mutant-reaksjonsblandingen.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Ingen påviselig $C_T$ for den interne kontrollen i samme rør som en testprøve med mutant-reaksjonsblandingen.
SAMPLE_NO_CN	Ingen kopinummer for en testprøve.
SAMPLE_NO_VALUE	Mutasjonsprosenten for en testprøve har ingen verdi.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Påvist $C_T$ er lavere enn forventet for en testprøve med mutant-reaksjonsblandingen.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Påvist $C_T$ er lavere enn forventet for en testprøve med villtype-reaksjonsblandingen.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	Den påviste $C_T$ -verdien er høyere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som en testprøve med villtype-reaksjonsblandingen.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	Den påviste $C_T$ -verdien er lavere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som en testprøve med villtype-reaksjonsblandingen.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Ingen påviselig $C_T$ for den interne kontrollen i samme rør som en testprøve med villtype-reaksjonsblandingen.
SATURATION	Rådatafluorescens blir sterkt mettet før infleksjonspunktet for amplifikasjonskurven.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	En topp er påvist i amplifikasjonskurven i nærheten av $C_T$ .
STEEP_BASELINE	En bratt stigende baseline for rådatafluorescens er påvist i amplifikasjonskurven.
STRONG_BASELINE_DIP	Et stort fall i baseline for rådatafluorescens er påvist i amplifikasjonskurven.
STRONG_NOISE	Sterk støy er påvist utenfor vekstfasen i amplifikasjonskurven.

Tabellen fortsetter på neste side.

Tabellen fortsetter fra forrige side

**Tabell 6. Ugyldiggjørende prøveflagg og beskrivelse av uttrykk (forts.)**

Flagg	Beskrivelse
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Sterk støy er påvist i vekstfasen (eksponentiell fase) i amplifikasjonskurven.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	En bølgeformet baseline for rådatafluorescens er påvist i amplifikasjonskurven.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	Mutasjonsprosenten for villtypekontrollen er for høy.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	Den påviste $C_T$ -verdien er høyere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som villtypekontrollen med mutantreaksjonsblandingen.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	Den påviste $C_T$ -verdien er lavere enn forventet for en intern kontroll i samme rør som villtypekontrollen med mutantreaksjonsblandingen.
WTC_IC_NO_CT (MT)	Ingen påviselig $C_T$ for den interne kontrollen i samme rør som villtypekontrollen med mutantreaksjonsblandingen.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Ingen påviselig $C_T$ for den interne kontrollen i samme rør som villtypekontrollen med villtype-reaksjonsblandingen.
WTC_NO_CN	Ingen kopinumner for villtypekontrollen.
WTC_NO_VALUE	Mutasjonsprosenten for villtypekontrollen har ingen verdi.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	Påvist $C_T$ er lavere enn forventet for villtypekontrollen med mutantreaksjonsblandingen.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	Påvist $C_T$ er lavere enn forventet for villtypekontrollen med villtype-reaksjonsblandingen.

**Tabell 7. Advarselprøveflagg og beskrivelse av uttrykk**

Flagg	Beskrivelse
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Den prosentvise fluorescensendringen for denne prøven i forhold til prøverøret med den største fluorescensendringen, er lavere enn en definert grense.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Reaksjonseffektiviteten for denne prøven har ikke nådd en definert grense.
SPIKE	En topp er påvist i rådatafluorescensen i amplifikasjonskurven, men utenfor området hvor $C_T$ bestemmes.



# Begrensninger

Settet er beregnet for profesjonell bruk.

Produktet skal bare brukes av fagpersoner som har fått spesialinstruksjoner og opplæring i molekylærbiologiske teknikker og som er kjent med enhetsteknologien. Enhetsprosedyren skal implementeres i et molekylærbiologisk laboratoriemiljø.

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er ikke en automatisert enhet, men analysen blir støttet av dedikert programvare for automatisk mutasjonskvantifisering.

Dette settet bør brukes i henhold til instruksjonene i denne håndboken, i kombinasjon med et godkjent instrument nevnt i "Materialer som er nødvendige, men ikke følger med", side 19.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene som er trykt på etikettene på esken og etikettene på rørene. Ikke bruk komponenter som er gått ut på dato.

Alle reagensene som følger med i *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, er utelukkende beregnet for bruk sammen med de andre reagensene i det samme settet. Manglende overholdelse av denne retningslinjen kan påvirke ytelsen.

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er kun validert for humant perifert fullblod som er antikoagulert med 2K-EDTA, fra pasienter med mistenkt eller diagnostisert MPN.

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er kun validert for bruk med QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236) eller QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr. 61104).

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er kun validert for bruk med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (for PCR) og QIASymphony SP (for prøveklargjøring).

Annen bruk av dette produktet enn det som angis på etikettene, og/eller modifisering av komponentene, vil annullere QIAGENs ansvar.

Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniskepatologiske funn. Fraværet av JAK2 V617F/G1849T-mutasjon ekskluderer ikke forekomsten av andre JAK2-mutasjoner. Testen kan rapportere falskt negative resultater i tilfeller med ytterligere mutasjoner i nukleotid 88504 til 88622 (16).

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for eventuelle prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av QIAGENs ytelsesundersøkelser.

# Ytelsesegenskaper

## Analytisk ytelse

### Grense for blank prøve

Grense for blank prøve (Limit of Blank, LOB) ble bestemt i samsvar med CLSI/NCCLS EP17-A2-standarden på 30 friske donorfullblodsprøver med en villtype (wild-type, WT) JAK2-status, som bruker tre reagensloter (120 målinger/lot).

LOB-resultatene er oppsummert i Tabell 8. Dette korresponderer til den forventede verdien i en normal populasjon ved bruk av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

**Tabell 8. Oppsummering av LOB-resultatene**

	Målt LOB	Endelig grense for blank prøve
Lot 1	0 %	
Lot 2	0 %	0%
Lot 3	0 %	

### Deteksjonsgrense

Deteksjonsgrense (Limit of Detection, LOD eller analytisk sensitivitet) ble bestemt basert på "Probit approach" beskrevet i CLSI/NCCLS EP17-A2-standarden. I denne studien ble 6 lave mutasjonsnivåer analysert for 3 uavhengige prøver (MPN-fullblods-DNA tilsatt i villtype (Wild-type, WT) fullblods-DNA), med 3 loter, 60 målinger per prøve og per mutasjon. De oppnådde resultatene indikerte at den analytiske sensitiviteten var 0,042 % for JAK2 V617F-mutasjon.

LOD-resultatene er oppsummert i Tabell 9.

Tabell 9. Oppsummering av LOD-resultatene

	Målt LOD	Endelig deteksjonsgrense
Lot 1	0,041 %	
Lot 2	0,029 %	0,042%
Lot 3	0,042 %	

## Kvantifiseringsgrense

Definisjon og bestemmelse av kvantifiseringsgrense (Limit of Quantitation, LoQ) var basert på CLSI/NCCLS EP17-A2-retningslinjen. LoQ ble definert som det laveste JAK2 V617F-mutasjonprosentnivået som nøyaktig kan skilles fra LoD for *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit med et konfidensintervall på 95 % (feilrisiko  $\alpha = 0,05$ ). Data fra repeterbarhetsstudien for et enkelt sted ble brukt til å beregne LoQ for *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. De oppnådde resultatene indikerte at LoQ er 0,233 % av JAK2 V617F-mutasjon.

I konteksten for molekylær sykdomsovervåking antyder dette at hvis den målte JAK2 V617F-mutasjonsprosenten er under 0,233 % på et gitt tidspunkt, kan ikke en reduksjon i JAK2 V617F-allelbyrden kvantifiseres på en pålitelig måte ved neste tidspunkt.

## Linearitet

Lineariteten til kvantifiseringen av JAK2-mutasjonen hos MPN-pasienter ble vurdert i samsvar med CLSI/NCCLS EP06AE-standarden, med én lot med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit og med testing på 11 mutasjonsnivåer for fem ulike DNA-input. Kvantifiseringen av JAK2-mutasjonsbyrden i MPN-prøver er lineær. Det vil si at *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er i stand til å kvantifisere prøver fra LoD-verdien til 100 % mutasjon, som tilsvarer de forventede verdiene i den påvirkede populasjonen, så lenge den kvantifiserte DNA-prøvekonsentrasjonen er tett opptil 10 ng/ $\mu$ l (mellom 5 og 20 ng/ $\mu$ l).

## Repeterbarhet og reproducerbarhet

Utformingen av presisjonsstudien for et enkelt sted oppfylder kravene i CLSI/NCCLS EP5-A3-standard. Testing ble utført på 11 mutasjonsnivåer, fra 0,07 % til 72,67 %, ved bruk av seriefortynninger av en klinisk prøve fra en MPN-pasient. For hvert mutasjonsnivå ble 108 målinger innhentet av tre operatører over 27 dager (to gjentakelser per kjøring og to kjøring per dag) ved bruk av tre loter med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit og tre Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenter. Presisjonen for nivået på 100 % blir uttrykt ved sammenligning med presisjonen fastsatt for nivået på 72,67 %, basert på trendanalyser støttet av ekstra data hentet fra en 100 % JAK2 V617F-prøve som består av DNA fra MUTZ-8-cellelinjen (38 målinger).

Resultatene er oppsummert i Tabell 10.

**Tabell 10. Presisjonsresultater: repeterbarhet (studie på ett sted)**

Prøve	Gj.snittlig JAK2-mutasjonsprosent	SD <sub>R+</sub>	SD <sub>RUN++</sub>	SD <sub>TOTAL+++</sub>	CV <sub>TOTAL</sub>
S0	100	ND	ND	≤ 5,45	≤ 7,50 %
S1	72,67	1,99	2,99	5,45	7,50%
S2	53,96	2,48	3,16	6,52	12,09%
S3	23,13	1,59	1,95	4,51	19,52%
S4	11,97	1,10	1,17	2,79	23,27%
S5	6,01	0,71	0,63	1,57	26,17%
S6	2,39	0,31	0,36	0,70	29,23%
S7	1,23	0,17	0,16	0,34	27,38%
S8	0,63	0,13	0,12	0,24	37,88%
S9	0,13	0,05	0,03	0,07	52,31%
S10	0,07	0,03	0,02	0,04	65,01%

SD: Standardavvik

R+: Repeterbarhet

RUN++: Presisjon mellom kjøring

TOTAL+++: Total presisjon (inkludert mellom instrumenter, mellom operatører og mellom loter).

CV<sub>TOTAL</sub>: Variasjonskoeffisient for total presisjon i prosent

ND: Ikke bestemt

Utformingen av studien for presisjon mellom laboratorier oppfyller kravene i CLSI/NCCLS EP5-A3-standarden. Studien omfatter fire steder (Frankrike, Tyskland og to steder i USA). Testing ble utført på sju mutasjonsnivåer, 1,21 % til 67,64 %, ved bruk av fortyninger av MUTZ-8-cellelinjen i friskt donorfullblod (dvs. konstruerte prøver). Hvert sted utførte tre DNA-ekstraksjonskjøringer med QIASymphony SP-instrumentet og et unikt parti av QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Hver DNA-ekstraksjon ble testet i åtte qPCR-kjøringer (to kjøring per dag og per sted over fire ikke-sammenhengende dager) ved bruk av et unikt parti *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, noe som ga 96 forventede målinger per prøve for alle stedene.

L2-prøven var ugyldig i én ekstraksjonskjøring, noe som ga et totalt antall på 88 qPCR-tester i stedet for 96. I tillegg var én qPCR-kjøring ugyldig, noe som førte til tre ugyldige tester for alle prøver (unntatt L2, dvs. 2 ugyldige resultater). I tillegg var L7-prøven ugyldig i én qPCR-kjøring og L4 var ugyldig i to qPCR-kjøringer, noe som førte til to ekstra ugyldige tester (Tabell 11).

Presisjonen for nivået på 100 % blir uttrykt ved sammenligning med presisjonen fastsatt for nivået på 67,64 %, basert på trendanalyser støttet av ekstra data hentet fra en 100 % JAK2 V617F-prøve som består av DNA fra MUTZ-8-cellelinjen (38 målinger).

**Tabell 11. Presisjonsresultater: reproduserbarhet (studie mellom laboratorier)**

Prøve	Totalt antall tester	Totalt antall ugyldige tester	JAK2%MT-gjennomsnitt	Innen kjøring, SD, %CV	Mellom kjøring innen dag, SD, %CV	Mellom dag, SD, %CV	Mellom sted, SD, %CV	Total, SD, %CV
L0	Ikke relevant	Ikke relevant	100	ikke relevant	ikke relevant	ikke relevant	ikke relevant	≤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-mutasjonsprosent; **SD:** Standardavvik; **CV:** Variasjonskoeffisient i prosent; **I/R:** Ikke relevant

En tilleggsstudie mellom laboratorier ble utført på tvers av tre teststeder (ett i Europa og to i USA), på fire fullblodsprøver fra MPN-pasienter (dvs. kliniske prøver). Hvert sted utførte tre DNA-ekstraksjonskjøringer. Hver DNA-ekstraksjon ble testet i 12 qPCR-kjøringer (én gjentakelse per kjøring per prøve, to kjøringer per dag per operatør på hvert sted – to operatører per sted var involvert – for tre ikke-sammenhengende dager) på ett Rotor-Gene Q MDx-instrument ved bruk av en enkelt lot med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. For hver prøve ble det innhentet 36 målinger (Tabell 12).

**Tabell 12. Ekstra studieresultater mellom laboratorier**

Prøve	N	JAK2%MT-gjennomsnitt	Innen kjøring, SD, %CV	Mellom kjøring innen dag, SD, %CV	Mellom dag, SD, %CV	Mellom sted, SD, %CV	Total, SD, %CV
Prøve 1	36	95,19	0,995, 1,04	0,000, 0,00	0,541, 0,57	0,000, 0,00	1,130, 1,19
Prøve 2	36	22,83	3,988, 17,47	0,000, 0,00	1,707, 7,48	1,552, 6,80	4,501, 19,72
Prøve 3	36	14,44	2,257, 15,63	1,398, 9,68	0,000, 0,00	1,422, 9,84	2,890, 20,01
Prøve 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-mutasjonsprosent; **N:** Antall målinger; **SD:** Standardavvik; **CV:** Variasjonskoeffisient i prosent

## Interfererende stoffer (analytisk spesifisitet)

Studiedesignet oppfyller kravene i NCCLS-standarden EP7-A3 "Interference Testing in clinical Chemistry" (Interferenstesting i klinisk kjemi). Totalt 19 stoffer som potensielt kan forekomme i blodprøver, ble valgt på grunn av sin potensielle effekt på PCR (busulfan, citalopramhydrobromid, paroksetinhydrokloridhemihydrat, sertralinhydroklorid, fluksetinhydroklorid, acetaminofen [paracetamol], ukonjugert bilirubin, kalium-2K EDTA og -3K EDTA, natrium-EDTA, Hgb [humant], triglyserider, lisinopriildihydrat, hydroksyurea, acetylsalisylsyre, salisylsyre, tiotepa, anagrelid, interferon alfa-2b).



Stoffer fra DNA-ekstraksjonsprosessen ble også vurdert (QSL1, QSB1, QSW1, QSW2 og PK fra QIASymphony DSP DNA Blood Mini Kit; QIAGEN Protease, etanol, AW1 og AW2 fra QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit).

De oppnådde resultatene viste ingen interfererende effekt for disse stoffene.

**Tabell 13. Interfererende stoffer**

Testet stoff	Testet konsentrasjon
Ukonjugert bilirubin	150,3 µg/ml
Hemoglobin [humant]	2000 µg/ml
Triglyserider	30 000 µg/ml
Busulfan	38,4 µg/ml
Citalopramhydrobromid	0,75 µg/ml
Paroksetinhydrokloridhemihydrat	1,14 µg/ml
Sertralinhydroklorid	0,67 µg/ml
Fluoksetinhydroklorid	3,87 µg/ml
Acetaminofen [paracetamol]	200,7 µg/ml
Lisinoprildihydrat	0,33 µg/ml
Hydroksyurea	28,2 µg/ml
Acetylsalisylsyre	651,6 µg/ml
Salisylsyre	0,6 µg/ml
Tiotepa	48 µg/ml
Anagrelid	6 µg/ml
Interferon alfa-2b*	1,8 MU/l
Kalium-EDTA (2K-EDTA)	2X (3600 µg/ml)
Kalium-EDTA (3K-EDTA) †	1X (1800 µg/ml), 3X (5400 µg/ml)

Tabellen fortsetter på neste side.

Tabellen fortsetter fra forrige side

**Tabell 13. Interfererende stoffer (forts.)**

Testet stoff	Testet konsentrasjon
Natrium-EDTA (2Na-EDTA) †	1X (3000 µg/ml), 3X (9000 µg/ml)
QSL1	2 % av totalt prøvevolum
QSB1	2 % av totalt prøvevolum
QSW1	2 % av totalt prøvevolum
QSW2	2 % av totalt prøvevolum
proteinase K (PK) ‡	2 % av totalt prøvevolum
proteinase K (PK) ‡	2x forventet gjenværende volum etter ekstraksjonsprosessen 3x forventet gjenværende volum etter ekstraksjonsprosessen
QIAGEN Protease	1,29 E-05 % av totalt prøvevolum
Etanol (EtOH)	1,29 E-03 % av totalt prøvevolum
Buffer AW1	1,00 E-01 % av totalt prøvevolum
Buffer AW2	1,00 % av totalt prøvevolum

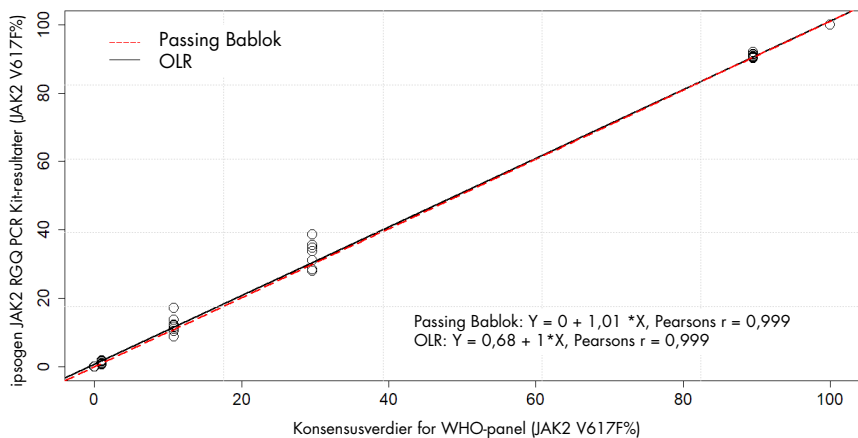
\* Den anbefalte doseringen for PV-pasienter er 3 MU, som er antatt at skal distribueres i 5 l blod (person på 80 kg), som gir en konsentrasjon på 0,6 MU/l. Etter anbefalinger fra NCCLS-standarden EP7-A2 ble tre ganger denne konsentrasjonen testet, dvs. 1,8 MU/l.

† 1x konsentrasjon i henhold til leverandør

‡ PK forårsaker en interfererende effekt når testet ved 2 % av totalt prøvevolum (usannsynlig er forekommer). Ytterligere testing bekreftet at PK fjernes under ekstraksjonsprosessen: Ingen interferens er forventet under normale bruksforhold.

## Testing av WHO's internasjonale referansepanel for genomisk JAK2 V617F (NIBSC, panelkode 16/120)

WHO's første internasjonale referansepanel for genomisk JAK2 V617F, utviklet av National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, panelkode 16/120) ble testet ved bruk av tre loter av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (tre gjentakelser per nivå av referansepanelet og per reagenslot). Forsøkene ble utført over tre dager av én operatør, ved bruk av ett Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument. Overensstemmelsen mellom *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-resultater og konsensusverdier publisert i bruksanvisningen for referansepanelet ble vurdert ved bruk av en vanlig lineær regresjon (helling: 1,003, 95 % CI [0,997; 1,010] – skjæringspunkt: 0,677, 95 % CI [0,212; 1,289]) og en Passing-Bablok-regresjon (helling: 1,01, 95 % CI [1,00; 1,021] – skjæringspunkt: 0,00, 95 % CI [-0,02; 0,010]) (Figur 22). Overensstemmelse er bekreftet, noe som demonstrerer egnethet for settet for å gi JAK2 V617F-data som stemmer med andre ofte brukte diagnostiske teknikker.



**Figur 22. Overensstemmelse mellom ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit-resultater og konsensusverdier for WHO's internasjonale referansepanel for genomisk JAK2 V617F (NIBSC, panelkode 16/120).** Overensstemmelse ble vurdert ved bruk av en vanlig lineær regresjon (Ordinary Linear Regression, OLR) og en Passing Bablok-regresjon. Panelet består av sju JAK2 V617F-nivåer: 100 %, 89,5 %, 29,6 %, 10,8 %, 1,00 %, 0,03 % og 0 %. WHO's konsensusverdier ble bestemt ved bruk av et område med vanlig brukte teknikker som en del av en internasjonal samarbeidsstudie. Referanseverdiene som bidro til hvert JAK2 V617F%-nivå, er medianverdier (du finner mer informasjon på <https://www.nibsc.org>).

## Sannferdighet og nøyaktighet

Målingssannferdighet er omvendt knyttet til systematisk målingsfeil (SE eller bias). Bias ble beregnet basert på instruksjoner fra NCCLS-retningslinje EP09c, for hvert JAK2 V617F%-nivå for referansepanelet, for hver reagenslot samt for alle reagensloter (Tabell 14), ved bruk av data fra studien beskrevet ovenfor. De høyeste biasverdiene ble innhentet med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-lot 2.

Nøyaktigheten er nærheten til overensstemmelse mellom et testresultat og den aksepterte referanseverdien (i dette tilfellet verdien tildelt hvert JAK2 V617F%-nivå i WHO-panelet). Nøyaktighet tar hensyn til både sannferdighet og presisjon og er omvendt proporsjonalt med total feil, beregnet som vist i Tabell 14.

Tabell 14. Bias og målingsfeil

WHO-panel <i>Ampullekode</i> Referanseverdi	<i>ipsogen JAK2</i> RGQ PCR Kit-lot	Bias (SE) per lot [95 % CI]	Bias (SE) totalt [95 % CI]	Total feil (nøyaktighet)
15/172 0%	1	0,000 [I/R]	0,001 [-0,001; 0,004]	0,010
	2	0,003 [-0,011; 0,018]		
	3	0,000 [I/R]		
15/170 0,03%	1	-0,010 [-0,053; 0,033]	0,003 [-0,021; 0,028]	0,024
	2	0,020 [-0,094; 0,134]		
	3	0,000 [-0,075; 0,075]		
15/168 1,00%	1	-0,310 [-0,621; 0,001]	0,066 [-0,276; 0,407]	0,363
	2	0,617 [0,016; 1,217]		
	3	-0,110 [-0,261; 0,041]		
15/166 10,8%	1	-0,183 [-4,523; 4,156]	1,207 [-0,630; 3,043]	2,521
	2	3,600 [-2,670; 9,870]		
	3	0,203 [-1,387; 1,793]		

Tabellen fortsetter på neste side.

Tabellen fortsetter fra forrige side

**Tabell 14. Bias og målingsfeil (forts.)**

WHO-panel Ampullekode Referanseverdi	ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit-lot	Bias (SE) per lot [95 % CI]	Bias (SE) totalt [95 % CI]	Total feil (nøyaktighet)
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 [I/R]		
	3	-0,013 [-0,028; 0,001]		

**SE:** Systematisk feil eller bias, dvs. forskjellen mellom gjennomsnitt for individuelle målinger innhentet med ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit ( $\bar{V}_{\text{JAK2 Kit}}$ ) og konsensusverdi for WHO's referansepanel ( $V_{\text{Ref}}$ ).

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

Total feil (Total Error, TE) beregnes som  $TE = \sqrt{s^2 + SE^2}$ , der s er standardavviket (tilfeldig feil).

95 % CI: 95 % konfidensintervall

**I/R:** ikke relevant

## Analytisk nøyaktighet

Formålet med denne studien var å validere den analytiske nøyaktigheten til *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit under forhold med normal bruk med kliniske prøver fra testpersoner hvor det er mistanke om myeloproliferativ neoplasia. Denne studien ble utført på gDNA-prøver ekstrahert fra totalt 473 prøver: 276 med mistenkt PV, 98 med ET og 99 med PMF. JAK2 V617F-statusen til pasientprøvene innhentet med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, ble sammenlignet med JAK2 V617F-status innhentet med referansemotoden for JAK2-statusbestemmelse, dvs. en uavhengig validert bidireksjonal sekvensering (BDS). Siden *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kits LoD er 0,042 % for JAK2 V617F, er JAK2 V617F-statusen til en pasientprøve testet med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, positiv over eller på denne grensen og negativ under denne grensen. Av de 473 prøvene var 22 prøver JAK2-positive med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, mens de var negative med BDS.

Den totale overensstemmelsen er 95,35 % (451/473 testpersoner; 95 % CI: 93,04 %, 97,06 %). Den positive overensstemmelsen var 100 % (165/165 testpersoner; 95 % CI: 97,79 %, 100 %), og den negative overensstemmelsen var 92,86 % (286/308 testpersoner; 95 % CI: 89,39 %; 95,47 %). Resultatene er vist i Tabell 15.

**Tabell 15. Overensstemmelse mellom *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit og Sanger bidireksjonal sekvensering i MPN-populasjon (kombinerte ET-, PMF- og PV-populasjoner)**

		Sanger bidireksjonal sekvensering		
		JAK2 V617F-positiv	JAK2 V617F-negativ	Totalt
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	JAK2 V617F-positiv	165	22	187
	JAK2 V617F-negativ	0	286	286
	Totalt	165	308	473



## Vurdering av analytisk nøyaktighet for studieresultater i MPN-kohorter

Overensstemmelsen mellom resultater innhentet for JAK2 V617F-mutasjonen med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit og med Sanger-sekvensering (BDS) hos testpersoner med ET, PMF og PV, er gitt hver for seg:

- For ET er den totale overensstemmelsen 89,8 % (88/98 testpersoner; 95 % CI: 82,03–95,0 %), den positive overensstemmelsen 100 % (43/43 testpersoner; 95 % CI: 91,78–100 %) og den negative overensstemmelsen 81,82 % (45/55 testpersoner; 95 % CI: 69,1–90,92 %).
- For PMF er den totale overensstemmelsen 93,94 % (93/99 testpersoner; 95 % CI: 87,27–97,74 %), den positive overensstemmelsen 100 % (51/51 testpersoner; 95 % CI: 93,02–100 %) og den negative overensstemmelsen 87,5 % (42/48 testpersoner; 95 % CI: 74,75–95,27 %).
- For PV er den totale overensstemmelsen 97,83 % (270/276 testpersoner; 95 % CI: 95,33–99,2 %), den positive overensstemmelsen 100 % (71/71 testpersoner; 95 % CI: 94,94–100 %) og den negative overensstemmelsen 97,07 % (199/205 testpersoner; 95 % CI: 93,74–98,92 %).

Prøvene som ga uoverensstemmende resultater, fremsto som å ha mutasjonsnivåer under BDS-påvisningsevnen (rundt 10 %). Siden Sanger-sekvensering ikke er like sensitiv som *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, som kan rapportere verdier helt ned til 0,042 % av JAK2 V617F (dvs. LoD-verdien), ble det utført en egen studie ved bruk av en validert neste generasjons sekvenseringsmetode (next-generation sequencing, NGS) til å påvise JAK2 V617F-allel i de 15/22 uoverensstemmende prøvene (ni ET, fem PMF og én PV), samt et tilfeldig utvalgt sett på 22 JAK2 V617F-positive og -negative overensstemmende prøver. JAK2 V617F-statusen til pasientprøver ble bestemt med NGS-metoden basert på dens grense for analytisk sensitivitet (dvs. mellom 1 % og 2 % av JAK2 V617F). Derfor var JAK2 V617F-statusen til en pasientprøve positiv hvis JAK2 V617F-mutasjonen ble påvist av NGS-metoden, og motsatt var JAK2 V617F-statusen negativ hvis JAK2 V617F-mutasjonen ikke ble påvist.

Alle 15 uoverensstemmende prøver testet positivt med NGS, i overensstemmelse med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Alle overensstemmende prøver testet det samme med NGS og i overensstemmelse med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit og BDS. De 7 andre prøvene ble ansett som uoverensstemmende, siden NGS-data ikke er tilgjengelig for disse prøvene.

## Konklusjon av studien for analytisk nøyaktighet

Etter reklassifisering av de uoverensstemmende tilfellene med NGS-resultater viste *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit 98,3 % i nøyaktighet for påvisning av JAK2 V617F-allel i prøver fra MPN-testpersoner med JAK2 V617F-nivåer  $\geq 0,042$  % (dvs. LoD-verdien).

## Klinisk ytelse

Den kliniske ytelsen til *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit i diagnostisering av PV ble evaluert under en multisenter, internasjonal, prospektiv intervensjonsstudie.

Formålet med studien var å vise nøyaktigheten til *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit for påvisning av V617F-mutasjonen hos testpersoner med mistenkt PV. Referansen for JAK2-statusbestemmelse var en uavhengig validert bidireksjonal sekvenseringsmetode (bi-directional sequencing, BDS).

Påvisning av JAK2 V617F-mutasjon ble først introdusert i WHO-referansekriteriene fra 2008 for diagnostisering av BCR-ABL-negativ MPN, og forekomst av denne mutasjonen er et hovedkriterium for diagnostisk bekreftelse (17).

Forekomst av JAK2 V617F er ett av de to hovedkriteriene for diagnostisering (PV blir bekreftet hvis to hovedkriterier og ett bikriterium eller det første hovedkriteriet og to bikriterier er til stede i henhold til WHO 2008\* (se referanse 17 for mer informasjon)).

Målet var å evaluere spesifisitet, sensitivitet, positiv prediktiv verdi (Positive Predictive Value, PPV), negativ prediktiv verdi (Negative Predictive Value, NPV) og sannsynlighet for diagnose etablert av WHO's diagnostiske kriterier fra 2008\* ved bruk av JAK2 V617F-statusbestemmelse ved bruk av enten *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit med en cutoff på 0,042 % for positivitet (dvs. settets LoD) eller BDS.

Studien ble utført ved ni studiesteder i USA (sju deltakende testpersoner), 12 studiesteder i Frankrike (alle 12 deltakende testpersoner) og ni studiesteder i Italia (fem deltakende testpersoner). Testpersoner ble undersøkt og valgt basert på inkluderingskriterier som anslo en PV-diagnose. Det ble tatt blodprøver fra alle deltakende testpersoner med både *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit og referansetesten, bidireksjonal sekvenseringsbestemmelse (BDS) av JAK2 V617F- og JAK2 ekson 12-status. Testpersoner med kliniske egenskaper som var kompatible med PV-diagnose (inkludert økte hemoglobinnivåer og reduserte erythropoietinnivåer [EPO]), men med negativ JAK2 V617F- og ekson 12-bestemmelse med BDS, og testpersoner med positiv JAK2 V617F- og ekson 12-bestemmelse med BDS og normale eller høye EPO-nivåer, som skulle gjennomgå en benmargsbiopsi med histologisk og cytogenetisk analyse, som påkrevd av WHO's diagnostiske algoritme fra 2008 for myeloproliferative sykdommer. Den endelige diagnosen (PV eller ikke PV) ble fastslått basert på resultatene av de ikke-undersøkende studieprosedyrene (dvs. 2008 WHO-kriteriene med bestemmelse av JAK2-mutasjon ved bruk av referanse-BDS-analysen).

Totalt 216 testpersoner definert som den evaluerbare populasjonen, omfattet alle deltakere som oppfylte både de kliniske undersøkelseskriteriene og analytiske kriteriene ved bruk av referanse-BDS-analysen. I tillegg var 67 testpersoner ikke evaluerbare av årsakene som er beskrevet i Tabell 16 (noen testpersoner var ikke evaluerbare på grunn av mer enn én årsak).

\* Siden den kliniske ytelsesstudien ble startet før 2016-oppdateringen av WHO's diagnostiske kriterier, ble 2008 WHO-kriteriene brukt til å utføre studien av klinisk ytelse.

**Tabell 16. Årsaker for utelukkelse i den deltagende populasjonen**

Årsak	Antall personer
Ikke oppfylt inkluderings- eller ekskluderingskriterier	9
Manglende EPO-resultater	22
Manglende BM-biopsi, om nødvendig for PV-diagnose	26
Positiv JAK2 V617F med BDS og serum-EPO innen normale grenser	15
Positiv JAK2 ekson 12 med BDS og serum-EPO innen normale grenser	1
Negativ JAK2 V617F med BDS og serum-EPO unormalt lavt	10
Pasienter fullførte ikke studien og/eller manglet endelig PV-diagnose	15

Til denne studien ble det utført totalt 221 JAK2 V617F-statusvurderinger (inkludert fem gjentatte tester) ved bruk av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet (Tabell 17, Tabell 18).

**Tabell 17. Oppsummering av testresultater for *ipsogen* JAK2 RGQ PCR (evaluerbar populasjon)**

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Totalt (N = 216)
JAK2 V617F-positiv ( $\geq$ LoD dvs. 0,042 %)	54
JAK2 V617F-negativ ( $<$ LoD dvs. 0,042 %)	162

**Tabell 18. Oppsummering av testresultater for *ipsogen* JAK2 RGQ PCR – JAK2 V617F-positiv populasjon (blant evaluerbar populasjon)**

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Totalt (N = 54)
Gjennomsnittsverdi for JAK2%MT innhentet	51,54
Minimumsverdi for JAK2%MT innhentet	0,14
Maksimumsverdi for JAK2%MT innhentet	93,43

**N:** Antall prøver; **JAK2 %MT:** JAK2-mutasjonsprosent

## Vurdering av valideringsstudieresultater: ytelsesresultat

Sammenligning av endelig PV- og ikke-PV-diagnose viste at de to metodene for diagnostisering var overensstemmende: 94,6 % av testpersonene (53/56 testpersoner) diagnostisert med PV av undersøkeren, ble også diagnostisert med PV ved bruk av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit og WHO's diagnostiseringskriterier. På lignende vis ble 95,6 % av testpersonene (153/160 testpersoner) som ble diagnostisert som ikke-PV av undersøkeren, også diagnostisert som ikke-PV med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit og WHO's diagnostiske kriterier (Tabell 19, Tabell 20).

Mutasjonsstatusen til JAK2 V617F og ekson 12 med BDS og JAK2 V617F med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er oppsummert i Tabell 19. En sammenligning av diagnosene PV og ikke-PV fastslått med hver testmetode er gitt i Tabell 19.

**Tabell 19. Mutasjonsstatus (JAK2 V617F med bidireksjonal sekvensering, JAK2 ekson 12 med bidireksjonal sekvensering og *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit) etter PV-status (evaluerbar populasjon)**

Variabel	PV (N = 56)	Ikke-PV (N = 160)	Totalt (N = 216)
<b>JAK2 V617F-mutasjonsstatus med BDS</b>			
Positiv	48 (85,7 %)	1 (0,6%)	49 (22,7%)
Negativ	8 (14,3 %)	159 (99,4%)	167 (77,3%)
<b>JAK2 ekson 12-mutasjonsstatus med BDS</b>			
Positiv	3 (5,4 %)	0	3 (1,4%)
Negativ	53 (94,6 %)	160 (100,0%)	213 (98,6%)
<b><i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit-status</b>			
Positiv	48 (85,7 %)	6 (3,8%)	54 (25%)
Negativ	8 (14,3 %)	154 (96,3%)	162 (75%)

**N:** Antall pasienter diagnostisert av undersøkeren (evaluert populasjon).

For hver mutasjonsstatus uttrykkes antall pasienter som et absolutt antall og som en prosent av den evaluerte populasjonen (i parentes).

**Tabell 20. Endelig PV-diagnose basert på undersøkerens mening informert av bidireksjonal testing og Verdens helseorganisasjons kriterier fra 2008 med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit**

Endelig diagnose fra undersøker basert på WHO's kriterier kombinert med JAK2-vurdering gjort med BDS.

Endelig diagnose basert på WHO's kriterier kombinert med JAK2-vurdering gjort med <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	PV (N=56)	Ikke-PV (N=160)	Totalt (N=216)
PV	53 (94,6 %)	1 (0,6%)	54 (25 %)
Ikke-PV	1 (1,8 %)	153 (95,6%)	154 (71,3%)
Ufullstendig	2 (3,6 %)	6 (3,8%)	8 (3,7%)

**N:** Antall pasienter diagnostisert av undersøkeren (evaluert populasjon).

Antall er uttrykt som et absolutt antall og som en prosent av den evaluerte populasjonen (i parentes).

## Ufullstendige tilfeller

Tre testpersoner var villtype for JAK2 V617F (både med BDS og *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit), i tillegg til å ha lave serum-EPO-konsentrasjoner og ufullstendig benmargshistologi (to ble diagnostisert som PV av undersøkeren og én som ikke-PV). Fem testpersoner var JAK2 V617F-villtype for BDS og positiv med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit og ingen benmargsbiopsiundersøkelse ble utført (alle fem ble diagnostisert som ikke-PV av undersøkeren). Til tross for fravær av eller ufullstendig benmargshistologi ble disse åtte tilfellene inkludert i beregningen av spesifisitet og sensitivitet (Tabell 21) som uoverensstemmende.

## Uoverensstemmende tilfeller

For to testpersoner var undersøkerens diagnose ulik diagnosen innhentet med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit innenfor WHO's diagnostiske kriterier. Én testperson hadde serum-EPO-nivåer innenfor det normale området (ved 16,5 IU/l) og ingen JAK2 V617F- eller ekson 12-mutasjon. Testpersonen ble imidlertid diagnostisert med PV i henhold til undersøkerens mening. Én testperson hadde serum-EPO-nivåer under normalområdet og en JAK2 V617F-mutasjon med

BDS, men ble gitt diagnosen ikke-PV i henhold til undersøkers mening. I henhold til protokollen skulle undersøkerens diagnose strengt ha fulgt WHO's diagnostiske kriterier fra 2008. Men i disse to uoverensstemmende tilfellene brukte undersøkere klinisk skjønn ved tolking av algoritmen.

Totalt, som oppsummert i Tabell 21, var sensitivitet for PV-diagnose ved bruk av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit 94,64 % (53/56 testpersoner; 95 % CI: 85,13 %, 98,88 %), som indikerer at denne analysen er forventet å påvise PV hos de fleste testpersoner med sykdommen. På lignende vis var spesifisiteten for PV-diagnose ved bruk av denne analysen 95,62 % (153/160 testpersoner; 95 % CI: 91,19 %, 98,22 %), som indikerer at det også er forventet å utelukke PV hos de fleste testpersoner uten PV.

I tillegg ble positiv prediktiv verdi (Positive Predictive Value, PPV) og negativ prediktiv verdi (Negative Predictive Value, NPV) også beregnet. PPV for settet var 88,33 % (53/60 testpersoner; 95 % CI: 77,27 %, 93,57 %), og NPV var 98,08 % (153/156 testpersoner; 95 % CI: 94,8 %, 99,4 %).

**Tabell 21. Analyse av sensitivitet, spesifisitet, PPV og NPV (evaluerbar populasjon)**

Variabel	Beregning (%)	Nedre 95 % konfidensgrense (%)	Øvre 95 % konfidensgrense (%)
Sensitivitet	94,64	85,13	98,88
Spesifisitet	95,62	91,19	98,22
PPV	88,33	77,27	93,57
NPV	98,08	94,8	99,4

Sannsynlighetsforholdet for en negativ test ved bruk av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, for PV-diagnose, innenfor WHO's diagnostiske kriterier var 21,6 (95 % CI: 10,44, 44,71), som indikerer at det JAK2 V617F-positive resultatet er mer sannsynlig hos testpersoner med PV enn hos de uten PV.

Sannsynlighetsforholdet for en positiv test ved bruk av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, for PV-diagnose, innenfor WHO's diagnostiske kriterier var 0,06 (95 % CI; 0,02, 0,18), som indikerer at det JAK2 V617F-negative resultatet er mindre sannsynlig hos testpersoner med PV enn hos de uten PV.

## Konklusjoner av den kliniske studien

Følgende konklusjoner kan trekkes fra analysene:

- Sensitivitet var 94,64 % (95 % CI; 85,13 %, 98,88 %), som indikerer at *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit innenfor WHO's diagnostiske kriterier er forventet å påvise PV hos de fleste testpersoner med sykdommen.
- Spesifisitet for PV-diagnose ved bruk av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit innenfor WHO's diagnostiske kriterier var 95,62 % (95 % CI; 91,19 %, 98,22 %), som indikerer at det også er forventet å utelukke PV hos de fleste testpersoner uten PV.
- Ved bruk av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit innenfor WHO's diagnostiske kriterier var PPV 88,33 % (95 % CI; 77,27 %, 93,57 %)\* og NPV 98,08 % (95 % CI; 94,8 %, 99,4 %).
- Sannsynlighetsforholdet for en negativ test ved bruk av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, for PV-diagnose, innenfor WHO's diagnostiske kriterier var 21,61 (95 % CI; 10,44, 44,71), som indikerer at det JAK2 V617F-positive resultatet er mer sannsynlig hos testpersoner med PV enn hos de uten PV.
- Sannsynlighetsforholdet for en positiv test ved bruk av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, for PV-diagnose, innenfor WHO's diagnostiske kriterier var 0,06 (95 % CI; 0,02, 0,18), som indikerer at det JAK2 V617F-negative resultatet er mye mindre sannsynlig hos testpersoner med PV enn hos de uten PV.

\* PPV er avhengig av prevalens. Siden prevalens var lav i studiepopulasjonen og sensitivitet og spesifisitet er uavhengig av prevalens, er sensitivitet og spesifisitet mer relevant.



## Oppsummering av sikkerhet og ytelse

Avsnittet med oppsummering av sikkerhet og ytelse kan lastes ned fra produktnettsiden for *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Dette finnes også på nettstedet til EUDAMED.

# Avfallshåndtering

- Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.
- Alle kjemikalier og biologiske materialer er potensielt farlige. Prøver kan være farlige og må behandles som smittefarlig biologisk materiale.
- Brukte prøverør, plater og avfall fra DNA-ekstraksjon må kastes i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.
- Remserør som er brukt under qPCR-protokollen, må kastes i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

## Referanser

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.

# Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. For teknisk assistanse og mer informasjon, se vårt tekniske supportsenters på [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) (se [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) for kontaktinformasjon).

For feilsøkingsinformasjon knyttet til ekstraksjonssett QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr. 61104) og QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236) kan du se tilhørende håndbøker. For feilsøkingsinformasjon knyttet til Rotor-Gene AssayManager v2.1 kan du se *brugerhåndbok for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

## Kommentarer og forslag

---

### Automatisert ekstraksjon

- |   |   |
|---|---|
| a) Prøve flagget som "unclear" (uklar)          | Dette kan skyldes en pause under ekstraksjonskjøringen. Hvis ekstraksjonskjøringen ble fullført, går du videre til trinnet for måling av OD-forhold og konsentrasjon. Hvis ikke gjentar du ekstraksjonskjøringen. |
| b) Prøve flagget som "unprocessed" (ubehandlet) | Dette tyder på en feil i innledende prøvevolum. Verifiser blodvolumet gjennom pipettering. Hvis volumet er for lavt, øker du det slik at prøven er 300 µl, og starter kjøringen på nytt.                          |
| c) Prøve flagget som "invalid" (ugyldig)        | Det oppsto en feil under ekstraksjonskjøringen. Gjenta ekstraksjonstrinnet for denne prøven.  |

## Kommentarer og forslag

---

- d) Feil med kjølebloktemperatur
- En feilmelding i slutten av kjøringen om kjøletemperaturen betyr at prøver ble oppbevart ved romtemperatur (15–25 °C) etter endt ekstraksjonskjøring. Hvis prøvene ble oppbevart ved romtemperatur i <12 timer, skal ikke dette påvirke kvaliteten på genomisk DNA, og genomisk DNA kan kvantifiseres. Hvis oppbevaringen var >12 timer, kan genomisk DNA-prøver være degradert. I så fall må du gjenta ekstraksjonen.
- e) Feil ved fjerning av elueringsplate
- I slutten av kjøringen kan det vises en feilmelding hvis elueringsplaten ble fjernet uten å merke av for den relevante handlingen på skjermen. Dette kan rettes ved å klikke på den relevante boksen.

### Generell fremgangsmåte for vurdering av JAK2-mutasjonsstatus med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit

#### Totalt kopinummer er ikke riktig og tilhørende prøve er ugyldig: amplifikasjonen er for lav

- a) Kontroller forholdet  $A_{260}/A_{280}$
- Hvis det er <1,7, må du utføre en ny DNA-ekstraksjon.
- b) Kontroller DNA-konsentrasjonen
- ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit er optimalisert for en arbeidskonsentrasjon på 10 ng/μl. Hvis DNA-konsentrasjonen ikke samsvarer med dette, må du fortynde eller ekstrahere DNA på nytt fra fullblod.
- c) Hvis begge parametrene er riktige, kan pipetteringsvolumer være feil
- Kontroller og recalibrer pipettene før du gjentar qPCR-trinnet.

### Kjørekontroll mislykkes på en QS-standard

- a) Ombytting av flasker
- b) Ombytting under distribusjon
- c) Krysskontaminering
- d) Standard delvis degradert
- e) PCR-reagenser delvis degradert
- f) Ikke-spesifikk amplifikasjon

Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Bytt ut alle kritiske reagenser, og gjenta forsøket med bruk av nye alikvoter. Sørg for alltid å håndtere prøver, settkomponenter og forbruksmaterialer i samsvar med allment akseptert praksis for å forhindre medrivingskontaminering.

Oppbevar settets innhold ved  $-30$  til  $-15$  °C, og oppbevar reaksjonsblandingen beskyttet mot lys.

Unngå gjentatt frysing og tining.

### Manglende eller lavt signal for én standard

- a) Homogenitetsproblem
- b) Bruk av samme reaksjonsblanding for WT og MT QS

Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet.

Gjenta PCR-kjøringen.

### Ikke-templatkontroll (No Template Control, NTC) av vann viser positiv amplifikasjon

- a) Krysskontaminering
- b) Reagenskontaminering
- c) Ombytting av remserør (rør som inneholder JAK2 V617F-positivt templat, satt inn i NTC-posisjon)
- d) Probedegradering

Bytt ut alle kritiske reagenser.

Sørg alltid for å håndtere prøver, settkomponenter og forbruksmaterialer i samsvar med allment akseptert praksis for å forhindre medrivingskontaminering.

Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet.

Oppbevar reaksjonsblandinger beskyttet mot lys.

Kontroller for falske positive på fluorescenskurven.

### Manglende signal, selv i standardkontroller

Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser	Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen.
---	---

### Fraværende eller lave signaler i prøver for IC og/eller totalt kopinummer (Total Copy Number, TCN) under validitetsområde, men kjørekontrollene er gyldige

Hemmende effekter på prøvematerialet, forårsaket av utilstrekkelig rensing	Kontroller alltid DNA-kvaliteten ved å måle forholdet $A_{260}/A_{280}$ og konsentrasjonen før start. Gjenta DNA-klargjøring.
--	--

### Villtypekontroll (Wild-Type Control, WTC) er positiv, men mutantkontroll (Mutant Control, MTC) er ikke positiv nok

Medrivingskontaminering	Bytt ut alle kritiske reagenser. Gjenta forsøket med nye alikvoter med alle reagenser. Sørg alltid for å håndtere prøver, settkomponenter og forbruksmaterialer i samsvar med allment akseptert praksis for å forhindre medrivingskontaminering. Sørg for at spissene skiftes ut mellom pipettering av forskjellige reagenser.
-------------------------	---



### **Villypekontroll (Wild-Type Control, WTC) forsterket med MT-reaksjonsblanding (i stedet for WT-reaksjonsblanding) og mutantkontroll (Mutant Control, MTC) forsterket med WT-reaksjonsblanding (i stedet for MT-reaksjonsblanding)**

- |   |   |
|---|---|
| a) Krysskontaminering   | Bytt ut alle kritiske reagenser.  |
| b) Reagenskontaminering   | Gjenta forsøket med nye alikvoter med alle reagenser.   |
| c) Ombytting av rør (rør som inneholder WTC, satt inn i MTC-posisjon og vice versa) | Sørg alltid for å håndtere prøver, settkomponenter og forbruksmaterialer i samsvar med allment akseptert praksis for å forhindre medrivingskontaminering.<br>Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. |

### **Invertert påvisning av positiv kontroll**

- |  |  |
|--|--|
| a) Krysskontaminering  | Bytt ut alle kritiske reagenser, og gjenta forsøket med bruk av nye alikvoter. Sørg for alltid å håndtere prøver, settkomponenter og forbruksmaterialer i samsvar med allment akseptert praksis for å forhindre medrivingskontaminering. |
| b) Ombytting av distribusjon av reaksjonsblanding i røret eller forblendingen. | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet.   |

### **Ikke signal fra prøve eller kontroll, selv ikke for intern kontroll**

- |   |   |
|---|---|
| a) Reaksjonsblanding eller én av komponentene i den (f.eks. Taq-polymerase) er ikke tilsatt | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Hvis den interne kontrollen ikke amplifiseres, ble ikke reaksjonsblandingen tilsatt, eller den er degradert. |
| b) Degradert reaksjonsblanding  | Gjenta qPCR-trinnet med ny reaksjonsblanding.   |

# Symboler

Følgende symboler vises i bruksanvisningen eller på emballasjen og etiketter:

## Symbol

## Symboldefinisjon



<N>

Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner



Siste forbruksdato



Dette produktet oppfyller kravene i den europeiske bestemmelsen 2017/746 for in vitro-diagnostiske medisinske enheter.

**IVD**

In vitro-diagnostisk medisinsk enhet

**REF**

Katalognummer

**LOT**

Lotnummer

**MAT**

Materialnummer (dvs. komponentmerking)

**GTIN**

Globalt artikkelnummer

**UDI**

Entydig utstyrsidentifikator

**CONT**

Inneholder

**COMP**

Komponent

**NUM**

Nummer

## Symbol

## Symboldefinisjon

Rn

R står for revisjon av bruksanvisningen, og n står for revisjonsnummeret



Temperaturbegrensning



Produsent



Se bruksanvisningen, som kan lastes ned fra [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623)



Skal beskyttes mot lys



Forsiktig, se medfølgende dokumenter

# Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Til 24 reaksjoner: Villtype JAK2-genkontroll, JAK2 V617F-kontrollgen, JAK2 WT- kvantifiseringsstandarder , JAK2 MT- kvantifiseringsstandarder, JAK2 WT reaksjonsblanding, JAK2 MT reaksjonsblanding, Taq DNA-polymerase, TE-buffer for fortyning, vann til NTC	674623
<b>Tilknyttede produkter</b>		
<b>Rotor-Gene Q MDx – for IVD-validert real-time PCR-analyse til klinisk bruk</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-sentrifuge og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og utførelse, installasjon og opplæring ikke inkludert	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-sentrifuge og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og utførelse, installasjon og opplæring	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Programvare for rutinemessig testing i kombinasjon med Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	En enkelt programvarelisens for installasjon på én datamaskin	9025620

Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminiumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med ékanalspipette i 72 x 0,1 ml rør.	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 remser med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 remser med 4 rør og lokk til 10 000 reaksjoner	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Til 50 klargjøringer: QIAamp Mini Spin Columns, buffere, reagenser, rør, VacConnectors	61104
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit	Til 192 klargjøringer på 200 µl hver: Inkluderer 2 reagenskassetter og enzymstativer og tilbehør.	937236
<b>QIAsymphony SP and accessories</b>		
QIAsymphony SP System	QIAsymphony-prøveklargjøringsmodul: Inkluderer installasjon og opplæring, 1-års garanti på deler og arbeid	9001751
QIAsymphony SP	QIAsymphony-prøveklargjøringsmodul: inkluderer 1-års garanti på deler og arbeid	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Prøveklargjøringskassetter med 8 brønner for bruk med QIAsymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers til bruk med QIAsymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Disposable Filter-Tips, i stativ, (8 x 128). Til bruk med QIAcube®- og QIAsymphony SP/AS-instrumenter	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Disposable Filter-Tips, i stativ, (8 x 128). Til bruk med QIAsymphony SP/AS-instrumenter	997024

Elution Microtubes CL (24 x 96)	Usterile polypropylenrør (0,85 ml maksimumskapasitet, mindre enn 0,7 ml oppbevaringskapasitet, 0,4 ml elueringskapasitet), 2304 i stativ på 96, inkludert lokkremser	19588
RNase A (17.500 U)	2,5 ml (100 mg/ml, 7000 enheter/ml, løsning)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml vevslyseringsbuffer for 1000 klargjøringer	19076

For oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, se bruksanvisningen for det aktuelle QIAGEN-settet. Bruksanvisninger for QIAGEN-sett kan fås på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan leveres fra QIAGENs tekniske serviceavdeling eller din lokale distributør.

# Endringshistorikk for dokument

## Revisjon

## Beskrivelse

---

R1, juli 2022

Første versjon

Denne siden skal være tom



### Begrenset lisensavtale for *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 RGQ PCR Kit

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne bruksanvisningen, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i panelet. QIAGEN gir ingen lisens for noen av sine årsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette panelet med andre komponenter som ikke er inkludert i dette panelet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne bruksanvisningen og andre protokoller som er tilgjengelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Noen av disse andre protokollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette panelet og/eller dets bruk ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette panelet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydnet, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av panelet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuelle immaterielle rettigheter forbundet med panelet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Varemerker: QIAGEN<sup>®</sup>, *ipsogen*<sup>®</sup> QIAamp<sup>®</sup>, QIAcube<sup>®</sup>, QIASymphony<sup>®</sup>, HotStarTaq<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup>, Rotor-Gene AssayManager<sup>®</sup> (QIAGEN Group); SYBR<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc.); Sarstedt<sup>®</sup> (Sarstedt AG & Co). Registrerte navn, varemerker osv. som brukes i dette dokumentet, skal ikke anses som ubeskyttet ved lov, selv når de ikke er spesielt merket som sådan.

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

Bestilling [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Teknisk støtte [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Nettsted [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)