

Septembre 2017

Manuel du kit *ipsogen*[®] JAK2 RGQ PCR



Pour utilisation avec l'instrument Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

Version 1

Diagnostic quantitatif in vitro

IVD

CE

REF

673623



1107956



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R5 **MAT**

1107956FR

Sommaire

| | |
|--|----|
| Utilisation prévue..... | 4 |
| Résumé et explication | 4 |
| Principe de la procédure | 6 |
| Matériel fourni | 9 |
| Contenu du kit | 9 |
| Matériel nécessaire mais non fourni..... | 10 |
| Avertissements et précautions..... | 12 |
| Précautions générales | 12 |
| Stockage et manipulation des réactifs | 14 |
| Conditions d'expédition | 14 |
| Conditions de stockage..... | 14 |
| Stabilité | 14 |
| Stockage et manipulation des prélèvements | 15 |
| Procédure | 16 |
| Extraction et préparation de l'ADN génomique à partir de sang total..... | 16 |
| Qualification et quantification de l'ADN | 23 |
| Normalisation de l'échantillon d'ADN génomique | 23 |
| Protocole : qPCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM..... | 24 |
| Interprétation des résultats | 33 |
| Guide de dépannage | 38 |
| Contrôle qualité | 40 |
| Limitations | 40 |
| Caractéristiques des performances | 41 |
| Limite du blanc | 41 |
| Limite de détection | 41 |
| Linéarité..... | 42 |
| Répétabilité et reproductibilité..... | 42 |
| Substances interférentes | 43 |
| Validation clinique et comparaison des méthodes | 43 |

| | |
|----------------------|----|
| Références | 45 |
| Symboles..... | 46 |
| Coordonnées | 47 |
| Pour commander | 48 |

Utilisation prévue

Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR est un test quantitatif in vitro permettant de détecter l'allèle JAK2 V617F/G1849T à partir d'ADN génomique extrait de sang total. Ce test est destiné à faciliter le diagnostic du syndrome myéloprolifératif (SMP) en tenant compte d'autres facteurs clinicopathologiques.

Résumé et explication

Une mutation somatique récurrente, V617F, affectant la Tyrosine Kinase Janus 2 (JAK2), a été identifiée en 2005 (1-4), ce qui a permis une avancée majeure dans la compréhension, la classification et le diagnostic du SMP. Le JAK2 est une molécule de signallement intracellulaire critique pour un certain nombre de cytokines dont l'érythropoïétine.

La mutation JAK2 V617F est détectée chez > 95 % des patients atteints de la maladie de Vaquez (PV), 50 à 60 % des patients atteints de thrombocytémie essentielle (TE) et chez 50 % des patients atteints de myélofibrose idiopathique (IMF). Le JAK2 V617F a également été détecté dans quelques rares cas de leucémie myélomonocytaire chronique, de syndrome myélodysplasique, de mastocytose systémique et de leucémie neutrophile chronique, mais dans 0 % des cas de leucémie myéloïde chronique (LMC) (5).

La mutation correspond au changement d'un seul nucléotide en position 1849 de la séquence JAK2, situé dans l'exon 14, entraînant la substitution d'une valine (V) par une phénylalanine (F) en position 617 de la protéine (domaine JH2). La mutation entraîne l'activation constitutive de JAK2, la transformation hématopoïétique in vitro et la croissance des colonies érythroïdes, indépendante de l'érythropoïétine (CEE) chez les patients atteints de PV et chez un grand nombre de patients atteints de TE et d'IMF (6). Si la mutation JAK2 V617F représente un élément clé dans la transformation des cellules hématopoïétiques dans le SMP, les mécanismes pathologiques exacts avec la même mutation unique menant à des entités cliniques et biologiques différentes doivent encore être élucidés.

Le diagnostic du SMP est généralement fondé sur des critères cliniques, des critères histologiques de la moelle osseuse et cytogénétiques. La découverte d'un marqueur moléculaire spécifique à une maladie permet de simplifier le processus de diagnostic et d'améliorer sa précision. La détection de la mutation JAK2 V617F fait désormais partie du critère de référence de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (classification de 2008) pour le diagnostic des SMP BCR-ABL négatifs (Tableau 1) et la présence de cette mutation est un critère majeur pour la confirmation du diagnostic.

Tableau 1. Critères de l'OMS pour le diagnostic des SMP (adaptés de la référence 7)

| Critères pour le diagnostic de la maladie de Vaquez (PV) | |
|--|--|
| Majeur | <p>1. Hémoglobine (Hgb) > 18,5 g.dl⁻¹ (hommes) ou > 16,5 g.dl⁻¹ (femmes) ou Hgb ou hématocrite > 99^{ème} centile de l'intervalle de référence pour l'âge, le sexe ou l'altitude de résidence ou</p> <p>Hgb > 17 g.dl⁻¹ (hommes) ou > 15 g.dl⁻¹ (femmes) si associé à une augmentation soutenue de ≥ 2 g.dl⁻¹ du niveau de ligne de base qui ne peut être attribuée à la correction de carences en fer ou</p> <p>Une masse élevée de globules rouges > 25 % au-dessus de la valeur normale médiane</p> <p>2. Présence de la mutation JAK2V617F ou d'une mutation similaire</p> |
| Mineur | <p>1. Myéloprolifération de la moelle osseuse sur les trois lignées</p> <p>2. Niveau d'érythropoïétine dans le sérum inférieur à la normale</p> <p>3. Croissance des CEE</p> |
| Critères pour le diagnostic de la TE | |
| Majeur | <p>1. Nombre de plaquettes ≥ 450 × 10⁹ L⁻¹</p> <p>2. Prolifération de la lignée mégacaryocytaire avec augmentation du nombre de mégacaryocytes matures et augmentés de taille</p> <p>Pas ou peu de prolifération de la lignée granulocytaire ou érythroïde</p> <p>3. Ne correspond pas aux critères de l'OMS pour LMC, PV, MF, SMD ou d'autres néoplasmes myéloïdes</p> <p>4. Démonstration de JAK2V617F ou d'un autre marqueur clonal ou</p> <p>Pas de preuve de thrombocytose réactive</p> |
| Mineur | - |
| Critères pour le diagnostic de la MF | |
| Majeur | <p>1. Prolifération de la lignée mégacaryocytaire et atypie accompagnée d'une fibrose réticulinique et/ou d'une fibrose collagène ou</p> <p>En l'absence d'une fibrose réticulinique, les changements mégacaryocytaires doivent être accompagnés d'une augmentation du nombre de cellules de la moelle osseuse, d'une prolifération de la lignée granulocytaire et d'une érythropoïèse souvent diminuée (c'est-à-dire une forme préfibrotique d'IMF)</p> <p>2. Ne correspond pas aux critères de l'OMS pour LMC, PV, SMD ou d'autres néoplasmes myéloïdes</p> <p>3. Démonstration de JAK2V617F ou d'un autre marqueur clonal ou</p> <p>Pas de preuve de fibrose réactive de la moelle</p> |
| Mineur | <p>1. Leucoérythroblastose</p> <p>2. Augmentation du lactate déshydrogénase dans le sérum</p> <p>3. Anémie</p> <p>4. Splénomégalie palpable</p> |

MLC : Leucémie myéloïde chronique ; CEE : Colonie endogène érythroïde ; TE : Thrombocythémie essentielle ; Hgb : Hémoglobine ; SMD : Syndrome myélodysplasique ; MF : Myélofibrose primitive ; PV : Polycythemia vera (maladie de Vaquez) ; OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

Depuis 2006, plusieurs méthodes reposant essentiellement sur les techniques de PCR ou de séquençage sont disponibles, sous forme de tests de laboratoire développés afin de détecter la présence et de potentiellement quantifier la mutation JAK2V617F. Ces tests présentent des performances analytiques différentes, en particulier en ce qui concerne la précision et le niveau de sensibilité. Cette différence risque d'avoir une incidence sur la nécessité d'effectuer une analyse de moelle osseuse, sur le temps requis pour établir un diagnostic final et, potentiellement, sur le résultat du diagnostic.

Principe de la procédure

Différentes techniques ont été proposées pour déterminer quantitativement la proportion de polymorphismes nucléotidiques (SNP) dans des échantillons d'ADN. Certaines de ces techniques, comme les courbes de fusion et le séquençage, sont seulement semi-quantitatives. Les méthodes reposant sur la réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) en temps réel sont privilégiées en raison de leur sensibilité plus élevée. L'utilisation d'une amorce SNP spécifique permet l'amplification sélective de l'allèle muté (MT) ou sauvage (WT), facilement détectable sur un instrument de qPCR en temps réel. Ceci permet une sensibilité $< 0,1 \%$, ce qui est conforme à la valeur seuil de JAK2 actuellement acceptée d' 1% qui est utilisée pour la positivité clinique. Cependant, il faut noter que certains experts cliniques considèrent la présence d'une charge de JAK2 comme étant cliniquement significative au moment du diagnostic, d'où l'importance d'une méthode sensible telle que la qPCR (8). Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR repose sur cette technique.

L'utilisation de la qPCR permet la quantification précise des produits de la PCR lors de la phase exponentielle du processus d'amplification par PCR. Les données quantitatives de PCR peuvent être rapidement obtenues sans procédure post-PCR par détection en temps réel de signaux fluorescents durant et/ou immédiatement après le cycle de PCR, ce qui réduit considérablement le risque de contamination des produits de la PCR. Actuellement, trois principaux types de techniques de qPCR sont disponibles : l'analyse qPCR utilisant le marqueur SYBR® Green I, l'analyse qPCR utilisant des sondes d'hydrolyse et l'analyse qPCR utilisant des sondes d'hybridation.

Ce test exploite le principe de qPCR par hydrolyse des oligonucléotides. Pendant la PCR, des amorces sens et anti-sens s'hybrident à une séquence spécifique. Un autre oligonucléotide lié à un marqueur est contenu dans le même mélange. Cette sonde, constituée d'un oligonucléotide marqué à l'aide d'un reporter 5' et d'un quencher 3' non marqué en aval, s'hybride à une séquence cible à l'intérieur du produit de la PCR. L'analyse qPCR par sondes d'hydrolyse exploite l'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase *Thermus aquaticus* (*Taq*). Quand la sonde est intacte, la proximité du reporter et du quencher entraîne la suppression de la fluorescence du reporter par transfert d'énergie de type Förster.

Durant la PCR, si la cible d'intérêt est présente, les amorces sens et anti-sens se fixent spécifiquement et cernent la sonde. L'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase clive la sonde entre le reporter et le quencher, seulement si les trois oligonucléotides sont hybridés à la cible. Les fragments de la sonde sont alors déplacés de la cible, puis la polymérisation du brin se poursuit. L'extrémité 3' de la sonde est bloquée afin d'éviter l'extension de la sonde lors de la PCR (Figure 1). Ce processus intervient à chaque cycle et n'interfère pas avec l'accumulation exponentielle du produit.

L'augmentation du signal fluorescent n'est détectée que si la séquence cible est complémentaire des amorces et de la sonde et donc amplifiée durant la PCR. Du fait de ces exigences, l'amplification non spécifique n'est pas détectée. Ainsi, l'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à l'amplification de la cible durant la PCR.

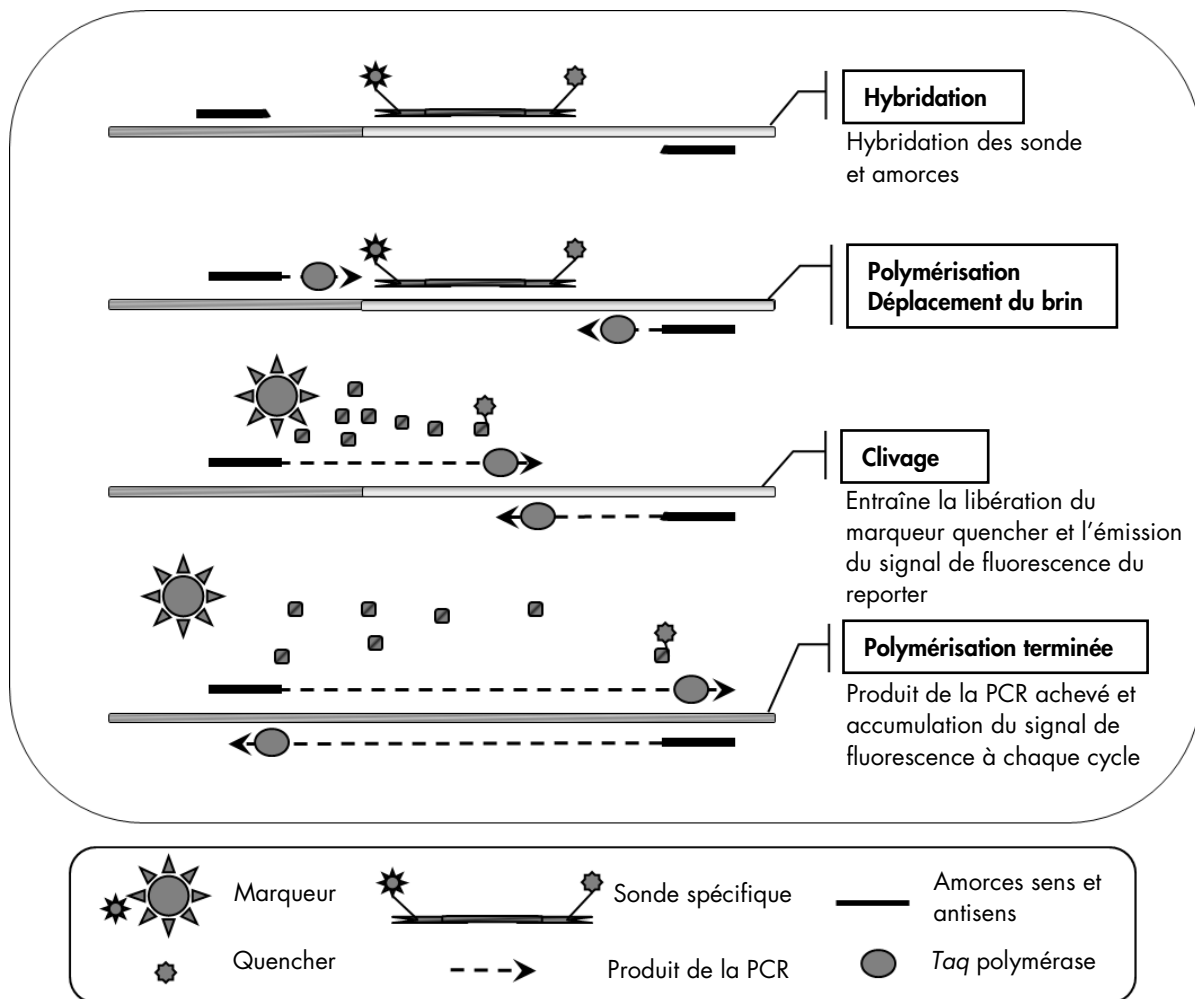


Figure 1. Principe de la réaction. La technologie PCR quantitative spécifique d'un allèle, utilisée dans ce kit de test, permet la détection sensible, précise et hautement reproductible des SNP. Cette technique repose sur l'utilisation d'amorces anti-sens spécifiques de l'allèle sauvage et de l'allèle V617F (8). Seul un appariement exact entre l'amorce et l'ADN cible permet une extension et une amplification durant la PCR (voir Figure 2).

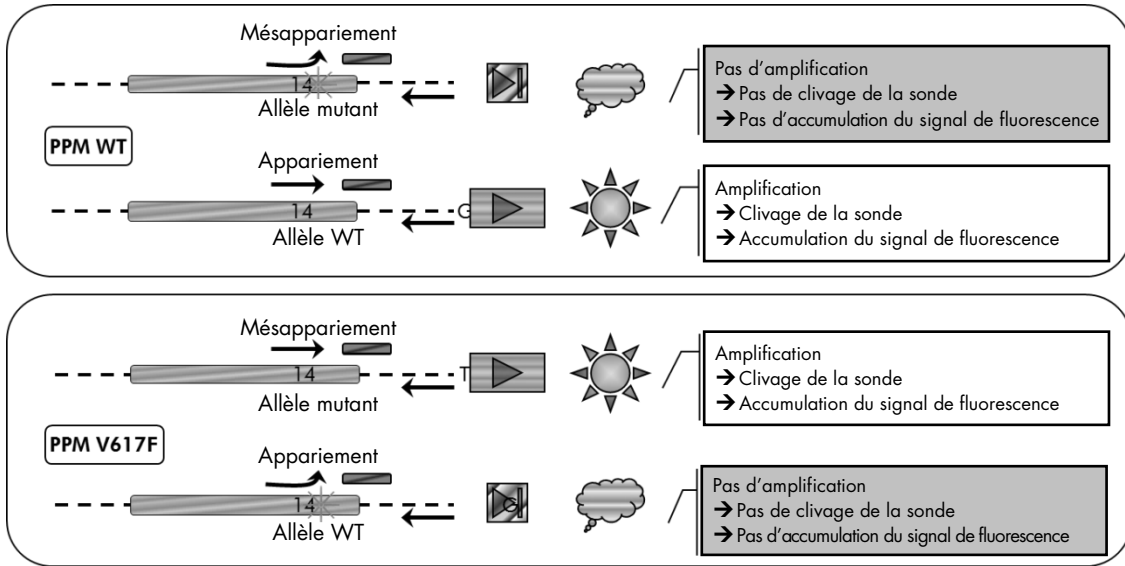


Figure 2. PCR spécifique d'un allèle. L'utilisation d'un mélange sonde et amorces sauvage ou V617F permet la détection spécifique de l'allèle sauvage ou de l'allèle muté en deux réactions distinctes sur le même échantillon. Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de copies VF par rapport à l'ensemble des copies JAK2.

Matériel fourni

Contenu du kit

| ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit (24) | | |
|---|--------|---------------|
| N° de référence | | 673623 |
| Nombre de réactions | | 24 |
| JAK2 Mutant Control (contrôle JAK2 mutant, 100 % allèle V617F) | Rouge | 33 µl |
| JAK2 WT Control (contrôle JAK2 WT, 100 % allèle sauvage) | Vert | 33 µl |
| JAK2 MT Quant Standard 1 (standard quant. 1 JAK2 MT, 5 x 10 ¹ copies V617F/5 µl) | Rouge | 20 µl |
| JAK2 MT Quant Standard 2 (standard quant. 2 JAK2 MT, 5 x 10 ² copies V617F/5 µl) | Rouge | 20 µl |
| JAK2 MT Quant Standard 3 (standard quant. 3 JAK2 MT, 5 x 10 ³ copies V617F/5 µl) | Rouge | 20 µl |
| JAK2 MT Quant Standard 4 (standard quant. 4 JAK2 MT, 5 x 10 ⁴ copies V617F/5 µl) | Rouge | 20 µl |
| JAK2 WT Quant Standard 1 (standard quant. 1 JAK2 WT, 5 x 10 ¹ copies de type sauvage/5 µl) | Vert | 20 µl |
| JAK2 WT Quant Standard 2 (standard quant. 2 JAK2 WT, 5 x 10 ² copies de type sauvage/5 µl) | Vert | 20 µl |
| JAK2 WT Quant Standard 3 (standard quant. 3 JAK2 WT, 5 x 10 ³ copies de type sauvage/5 µl) | Vert | 20 µl |
| JAK2 WT Quant Standard 4 (standard quant. 4 JAK2 WT, 5 x 10 ⁴ copies de type sauvage/5 µl) | Vert | 20 µl |
| JAK2 MT Reaction Mix (mélange réactionnel JAK2 MT)* | Rouge | 1 010 µl |
| JAK2 WT Reaction Mix (mélange réactionnel JAK2 WT)† | Vert | 1 010 µl |
| Taq ADN polymérase (HotStarTaq® 5 unités/µl) | Menthe | 85 µl |
| Tampon TE pour dilution de l'échantillon | Blanc | 1,9 ml |
| Eau pour NTC (contrôle négatif) | Blanc | 1,9 ml |
| ipsogen® JAK2 RGQ PCR Kit Handbook (manuel anglais) | | 1 |

* Mélange pour PCR contenant tous les composants requis sauf Taq ADN polymérase et ADN cible pour l'allèle MT.

† Mélange pour PCR contenant tous les composants requis sauf Taq ADN polymérase et ADN cible pour l'allèle WT.

Matériel nécessaire mais non fourni

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

Consommables et réactifs pour l'extraction manuelle de l'ADN

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (n° réf. 61104)
- Éthanol (96 - 100 %)

Remarque : ne pas utiliser d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances, telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

Consommables et réactifs pour l'extraction automatisée de l'ADN

- QIAasymphony® DSP DNA Mini Kit (n° réf. 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (cartouches de préparation d'échantillons à 8 puits) (n° réf. 997002)
- 8-Rod Covers (manchons pour 8 barreaux) (n° réf. 997004)
- Filter-Tips (embouts à filtre), 1 500 µl (n° réf. 997024)
- Filter-Tips (embouts à filtre), 200 µl (n° réf. 990332)
- Elution Microtubes CL (microtubes d'éluion CL) (n° réf. 19588)
- Tip disposal bags (sachets pour bouchons usagés) (n° réf. 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (microtubes 2,0 ml type H) (Sarstedt®, n° réf. 72.694, www.sarstedt.com)

Consommables et réactifs pour PCR

- Pointes de pipette pour PCR avec filtre hydrophobe, stériles, exempts de nucléase et aérosol-résistants
- Tubes de PCR sans nucléase de 1,5 ml ou 2,0 ml
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (barrettes de tubes et de capuchons de 0,1 ml) pour l'instrument Rotor-Gene Q (n° réf. 981103 ou 981106)
- Glace

Équipement

- Micropipettes (adaptables) * conçues pour la PCR (1 - 10 µl ; 10 - 100 µl ; 100 - 1 000 µl)
- Gants jetables
- Agitateur Vortex
- Bloc chauffant pour la lyse des échantillons à 56 °C
- Centrifugeuse de paillasse† avec rotor pour tubes de réaction de 0,5 ml/1,5/2,0 ml (capable d'atteindre 13 000 à 14 000 tr/min)
- Spectrophotomètre

Équipement pour préparation automatisée des échantillons

- Instrument QIASymphony SP (réf. 9001297), version logicielle 4.0 ou supérieure, accessoires fournis et protocole **Blood_200_V7_DSP**
- Insert de tube 3B (Insert, 2.0 ml v2, sample carrier (samplecarr.) (24), Qsym, n° réf. 9242083)

Équipement pour PCR

- Instrument de PCR en temps réel* : Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM et accessoires fournis
- Logiciel installé Rotor-Gene AssayManager® v2.1.x (x ≥ 0)
- Plug-in Gamma du Rotor-Gene AssayManager installé v1.0.x (x ≥ 0)
- Profil de test JAK2 CE importé (ipsogen_JAK2_blood_CE_V1_0_x (x ≥ 0))

* S'assurer que les instruments ont été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN® et chaque composant.

ATTENTION



ATTENTION : NE PAS ajouter d'eau de javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation des échantillons.

Précautions générales

L'utilisation des tests de qPCR nécessite de bonnes pratiques de laboratoire, incluant la maintenance de l'équipement, spécifiques à la biologie moléculaire et en accord avec les réglementations applicables et les normes pertinentes.

L'utilisation de ce kit est destinée au diagnostic in vitro. Les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été validés pour obtenir des performances optimales.

- Le test est destiné à une utilisation avec des échantillons de sang total anti-coagulés avec du potassium EDTA et conservés entre 2 et 8 °C pendant au maximum 96 heures avant l'extraction de l'ADN.
- Tous les produits chimiques et biologiques sont potentiellement dangereux. Les prélèvements et échantillons présentent un risque potentiel d'infection et doivent être traités comme du matériel présentant un risque biologique.
- Jeter les échantillons et les tests usagés conformément aux procédures de sécurité locales.
- Les réactifs du kit *ipsogen JAK2 RGQ PCR* sont dilués de manière optimale. Ne pas effectuer de dilution supplémentaire des réactifs : celle-ci pourrait entraîner une baisse des performances.
- Ne pas utiliser de volume réactionnel (mélange réactionnel + échantillon) inférieur à 25 µl.
- Tous les réactifs fournis dans le kit *ipsogen JAK2 RGQ PCR* sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit. Ne pas interchanger les réactifs

d'un kit avec les mêmes réactifs d'un autre kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR, même du même lot, car cela risquerait d'en affecter les performances.

- Consulter le manuel d'utilisation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM et le manuel d'utilisation du RGAM 2.1 pour plus d'informations sur les avertissements, précautions et procédures.
- Une modification des temps et des températures d'incubation peut provoquer des données erronées ou discordantes.
- Ne pas utiliser de composants périmés ou mal conservés.
- Les mélanges réactionnels peuvent être altérés s'ils sont exposés à la lumière.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination des mélanges avec le matériel synthétique contenu dans les réactifs Standard Quant JAK2 MT et JAK2 WT, et avec les contrôles JAK2 Mutant et JAK2 WT.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter les contaminations par d'autres ADN ou les contaminations croisées par les produits de PCR, qui peuvent générer des signaux faux positifs.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination par la DNase, qui peut provoquer la dégradation de l'ADN de contrôle.
- Utiliser des pipettes individuelles spéciales pour préparer les mélanges réactionnels et ajouter les matrices.
- Ne pas ouvrir l'instrument Rotor-Gene Q MDx avant la fin de l'analyse.
- Ne pas ouvrir les tubes Rotor-Gene Q une fois l'analyse terminée.
- Faire preuve de prudence pour garantir un test correct des échantillons. Une attention toute particulière doit être accordée aux mauvaises entrées d'échantillons ainsi qu'aux erreurs de chargement ou de pipetage.
- S'assurer à tout moment de manipuler les échantillons de manière systématique afin d'assurer une identification correcte permettant de garantir leur traçabilité

Il est par conséquent recommandé :

- D'utiliser des consommables exempts de nucléase (par ex. pipettes, cônes, tubes) et de porter des gants lors de l'expérience.
- D'utiliser de nouveaux cônes aérosol-résistants à toutes les étapes de pipetage pour éviter les contaminations croisées des échantillons et des réactifs.
- De préparer le pré-mélange pour PCR avec du matériel dédié (pipettes, pointes, etc.) dans une zone spéciale où aucune matrice d'ADN (ADN, plasmides ou produits de PCR) n'est introduite. D'ajouter les échantillons dans une zone séparée (de préférence dans une autre pièce) avec du matériel spécifique (pipettes, pointes, etc.).

Pour des informations de sécurité concernant les kits d'extraction QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n° réf. 61104) et QIASymphony DNA DSP Mini Kit (n° réf. 937236), consulter les manuels correspondants.

Stockage et manipulation des réactifs

Conditions d'expédition

Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR est expédié sur un lit de glace sèche. Si un des composants du kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR (à l'exception de l'enzyme) n'est pas congelé dès l'arrivée, que l'emballage extérieur a été ouvert au cours du transport, que le colis ne contient pas de notice d'emballage, de manuel ou de réactifs, prière de contacter l'un des départements de support technique ou l'un des distributeurs locaux de QIAGEN (voir quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Conditions de stockage

Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR doit être stocké dès réception entre -30 °C et -15 °C dans un congélateur à température constante et protégé de la lumière.

Pour des informations sur la conservation des kits d'extraction QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n° réf. 61104) et QIASymphony DNA DSP Mini Kit (n° réf. 937236), consulter les manuels correspondants.

Stabilité

Lorsqu'il est stocké dans les conditions de conservation spécifiées, le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la boîte.

Une fois ouverts, les réactifs peuvent être conservés dans leur emballage d'origine à une température comprise entre -30 et -15 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la boîte. Éviter la congélation et décongélation à répétition. Ne pas dépasser un maximum de 5 cycles de congélation/décongélation.

Pour des informations sur la stabilité des kits d'extraction QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n° réf. 61104) et QIASymphony DNA DSP Mini Kit (n° réf. 937236), consulter les manuels correspondants.

- Mélanger doucement le tube en le retournant 10 fois et centrifuger tous les tubes à l'exception de celui de l'enzyme avant ouverture.
- Les dates de péremption de chaque réactif sont mentionnées sur les étiquettes individuelles de chaque composant. Dans des conditions correctes de conservation, le produit conservera ses performances pendant la période de stabilité, pourvu que les mêmes lots de composants soient utilisés.
- Chez QIAGEN, les procédures de contrôle de la qualité utilisent des tests fonctionnels de validation des kits pour chaque lot individuel. Par conséquent, il ne faut pas mélanger les réactifs de différents kits, même s'ils sont du même lot.

Stockage et manipulation des prélèvements

Échantillons de sang total

Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR est destiné à une utilisation avec des échantillons d'ADN génomique extraits à partir d'échantillons de sang total anti-coagulés à l'aide de potassium EDTA et conservés selon l'une des méthodes suivantes :

- Entre 2 °C et 8 °C pendant au maximum 96 heures,
- Entre 15 °C et 25 °C pendant au maximum 96 heures ou
- Congelés entre -15 °C et -30 °C pendant au maximum 1 mois.

Remarque : les échantillons de sang total doivent être expédiés dans les mêmes conditions que celles de leur conservation afin d'éviter tout changement de température lors du stockage et du transport.

Échantillons d'ADN génomique

Une fois l'ADN génomique extrait, les échantillons peuvent être conservés et transportés entre -30 °C et -15 °C pendant 15 mois maximum, soit directement après extraction, soit après dilution dans du tampon TE.

Procédure

Extraction et préparation de l'ADN génomique à partir de sang total

L'ADN génomique doit être extrait à l'aide du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n° réf. 61104) ou de l'instrument QIASymphony SP, en combinaison avec le QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n° réf. 937236).

S'assurer que les réactifs à utiliser ne sont pas périmés et qu'ils ont été transportés et conservés dans les conditions correctes.

Remarque : le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR n'a été validé que pour une utilisation conjointe avec le QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n° réf. 61104) ou le QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n° réf. 937236). Ne pas utiliser d'autre produit d'extraction de l'ADN.

Extraction manuelle de l'ADN génomique à l'aide du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

L'extraction manuelle de l'ADN génomique doit être effectuée à l'aide du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n° réf. 61104) conformément au Manuel du kit QIAamp DSP DNA Blood (*QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook*) correspondant.

À effectuer avant de commencer

- **Équilibrer les échantillons sanguins à température ambiante (entre 15 et 25 °C) et s'assurer qu'ils sont bien homogénéisés.**

- **Préparation du tampon de lyse**

Si un précipité s'est formé dans le tampon de lyse (AL), le dissoudre par une incubation à 56 °C.

- **Préparation de la protéase QIAGEN**

Ajouter 1,2 ml de solvant de protéase (PS) au flacon de protéase QIAGEN (QP) et mélanger soigneusement. Afin d'éviter la formation de mousse, mélanger en retournant le flacon plusieurs fois. S'assurer que la protéase QIAGEN (QP) est totalement dissoute.

Remarque : ne pas ajouter directement la QP au tampon de lyse (AL).

- **Préparation du tampon de lavage 1**

À l'aide d'une éprouvette graduée, ajouter 25 ml d'éthanol (96 à 100 %) au flacon contenant 19 ml de concentré de tampon de lavage 1 (AW1). Conserver le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué à température ambiante entre 15 et 25 °C.

Remarque : toujours mélanger le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué en retournant le flacon plusieurs fois avant de démarrer la procédure.

- **Préparation du tampon de lavage 2**

À l'aide d'une éprouvette graduée, ajouter 30 ml d'éthanol (96 à 100 %) au flacon contenant 13 ml de concentré de tampon de lavage 2 (AW2). Conserver le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué à température ambiante entre 15 et 25 °C.

Remarque : toujours mélanger le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué en retournant le flacon plusieurs fois avant de démarrer la procédure.

- **Préparation du tampon d'éluion**

Un flacon de tampon d'éluion (AE) est fourni dans le kit. Afin d'éviter toute contamination du tampon d'éluion (AE), il est vivement recommandé d'utiliser des pointes de pipette avec filtres anti-aérosols lors du pipetage du tampon d'éluion (AE) depuis le flacon et de remettre le bouchon sur le flacon immédiatement après.

Équilibrer le tampon d'éluion (AE) à température ambiante (entre 15 et 25 °C).

- **Régler un bloc chauffant à 56 °C en vue de son utilisation à l'étape 4.**

Procédure

1. Pipeter 20 µl de protéase QIAGEN (QP) dans un tube de lyse (LT).

Remarque : vérifier la date de péremption de la protéase reconstituée avant utilisation.

2. Ajouter 200 µl d'échantillon sanguin au tube de lyse (LT).
3. Ajouter 200 µl de tampon de lyse (AL) au tube de lyse, fermer le couvercle, puis mélanger à l'aide d'un agitateur vortex pendant 15 secondes.

Remarque : afin de garantir une lyse efficace, il est primordial que l'échantillon et le tampon de lyse (AL) soient complètement mélangés de façon à obtenir une solution homogène.

Remarque : le tampon de lyse (AL) présentant une viscosité élevée, s'assurer d'ajouter le volume correct de tampon de lyse (AL) en pipetant avec le plus grand soin et en utilisant une pipette appropriée.



Ne pas ajouter directement la protéase QIAGEN (QP) au tampon de lyse (AL).

4. Incuber à 56 °C (± 1 °C) pendant 10 minutes (± 1 minute).

5. Centrifuger le tube de lyse (LT) pendant environ 5 secondes à pleine vitesse afin d'éliminer les gouttes à l'intérieur du couvercle.
6. Ajouter 200 µl d'éthanol (96 - 100 %) au tube de lyse (LT), fermer le couvercle, puis bien mélanger à l'aide d'un agitateur vortex pendant ≥ 15 secondes.
7. Centrifuger le tube de lyse (LT) pendant ≥ 5 secondes à pleine vitesse afin d'éliminer les gouttes éventuelles à l'intérieur du couvercle.
8. Appliquer soigneusement la totalité du lysat de l'étape 7 à la colonne QIAamp Mini Spin sans mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne QIAamp Mini Spin avec la pointe de la pipette.

Remarque : si plusieurs échantillons sont traités, ouvrir un seul tube de lyse (LT) à la fois.

9. Fermer le couvercle de la colonne QIAamp Mini spin, puis centrifuger à environ 6 000 x g pendant 1 minute. Placer la colonne QIAamp Mini spin dans un tube de lavage (WT) propre, puis jeter le tube contenant le filtrat.

Remarque : si le lysat n'est pas complètement passé à travers la membrane après une centrifugation à 6 000 x g (8 000 tr/min), centrifuger à nouveau à pleine vitesse (jusqu'à 20 800 x g) pendant 1 minute.


Remarque : si le lysat n'est toujours pas passé à travers la membrane lors de la centrifugation, jeter l'échantillon et répéter l'isolation et la purification avec de nouvelles substances d'échantillon.

10. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp Mini spin, puis ajouter 500 µl de tampon de lavage 1 (AW1) sans mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne QIAamp Mini Spin avec la pointe de la pipette.
11. Fermer le couvercle de la colonne QIAamp Mini spin, puis centrifuger à environ 6 000 x g (8 000 tr/min) pendant 1 minute. Placer la colonne QIAamp Mini spin dans un tube de lavage (WT) propre, puis jeter le tube contenant le filtrat.
12. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp Mini spin, puis ajouter 500 µl de tampon de lavage 2 (AW2) sans mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne QIAamp Mini Spin avec la pointe de la pipette.
13. Fermer le couvercle de la colonne QIAamp Mini spin, puis centrifuger à pleine vitesse (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min) pendant 1 minute. Placer la colonne QIAamp Mini spin dans un tube de lavage (WT) propre, puis jeter le tube contenant le filtrat.
14. Centrifuger à pleine vitesse (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min) pendant 3 minutes afin de sécher entièrement la membrane.
15. Placer la colonne QIAamp Mini spin dans un tube d'élution (ET) propre, puis jeter le tube de lavage (WT) contenant le filtrat. Ouvrir avec précaution le couvercle de la colonne QIAamp Mini spin, puis appliquer 50 à 200 µl de tampon d'élution (AE) au centre de la membrane.

Fermer le couvercle et incuber à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant 1 minute.
Centrifuger à environ 6 000 x g (8 000 tr/min) pendant 1 minute afin d'éluer l'ADN.

16. Jeter les plaques et les tubes d'échantillon usagés conformément aux réglementations de sécurité locales.


Extraction automatisée de l'ADN génomique à l'aide du QIASymphony DSP DNA Mini Kit

L'extraction automatisée de l'ADN génomique doit être effectuée avec l'instrument QIASymphony et à l'aide du module de préparation des échantillons, combiné au QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n° réf. 937236) et en suivant les instructions du Manuel du QIASymphony DSP DNA Kit (*QIASymphony DSP DNA Kit Handbook*). Les caractéristiques du protocole JAK2 sont indiquées à l'aide du symbole  dans la procédure ci-dessous.

Avec le système QIASymphony SP, le QIASymphony DSP DNA Mini Kit permet une purification automatisée de l'ADN à partir de sang total humain (à l'aide du protocole Blood_200_V7_DSP du QIASymphony).

- Aucun pré-traitement n'est requis
- Les tubes sont transférés directement sur le QIASymphony
- La purification de l'ADN est effectuée à l'aide de particules magnétiques

Points importants avant de commencer

-  Le volume de sang total à extraire est de 300 µl.
- S'assurer de bien comprendre le fonctionnement du QIASymphony SP. Se reporter aux manuels d'utilisation fournis avec votre instrument pour obtenir les instructions d'utilisation.
- Les opérations de maintenance optionnelle ne sont pas obligatoires pour faire fonctionner l'instrument, mais elles sont vivement recommandées afin de réduire le risque de contamination.
- Avant d'utiliser une cartouche de réactif pour la première fois, vérifier que les tampons QSL1 et QSB1 ne contiennent aucun précipité. Si nécessaire, retirer les cuves contenant les tampons QSL1 et QSB1 de la cartouche de réactif et incuber pendant 30 minutes à 37 °C en agitant de temps en temps pour dissoudre le précipité. S'assurer de remettre les cuves dans leurs positions correctes. Si la cartouche de réactif est déjà percée, s'assurer que les cuves sont scellées à l'aide des bandelettes de scellage réutilisables et incuber la cartouche de réactif complète pendant 30 minutes à 37 °C dans un bain-marie en agitant de temps en temps.

- Éviter toute agitation vigoureuse de la cartouche de réactif (RC), qui risquerait de faire apparaître de la mousse et d'entraîner des problèmes de détection du niveau de liquide.

À effectuer avant de commencer

- Avant de démarrer la procédure, s'assurer que les particules magnétiques sont totalement remises en suspension. Agiter vigoureusement au vortex la cuve contenant les particules magnétiques pendant au moins 3 minutes avant la première utilisation.
- S'assurer que l'opercule est positionné sur la cartouche de réactif et que le couvercle de la cuve des particules magnétiques a bien été retiré ou, si une cartouche de réactif entamée est utilisée, s'assurer que les bandelettes de scellage réutilisables ont bien été retirées.
- Veiller à ouvrir les tubes contenant l'enzyme.
- Si les échantillons sont munis de codes-barres, orienter les échantillons dans le portoir de tubes de façon que les codes-barres soient en face du lecteur de code-barres sur le côté gauche du QIASymphony SP.

Procédure

1. Fermer tous les tiroirs et la hotte.
2. Allumer le QIASymphony SP et attendre que s'affiche l'écran « Sample Preparation » (préparation des échantillons) et que la procédure d'initialisation se termine.
Remarque : l'interrupteur d'alimentation se situe dans le coin inférieur gauche du QIASymphony SP.
3. Se connecter à l'instrument.
4. S'assurer que le tiroir des déchets (« Waste ») est préparé correctement et effectuer un scan des stocks du tiroir des déchets, y compris le réservoir des bouchons usagés et des déchets liquides. Au besoin, remplacer le sachet de bouchons usagés.
5. Charger le portoir d'éluats requis dans le tiroir « Eluate » (Éluat).
Ne pas charger une plaque 96 puits à l'emplacement d'éluat 4 (« Elution slot 4 »).
Utiliser uniquement l'emplacement d'éluat 1 (« Elution slot 1 ») avec l'adaptateur de refroidissement correspondant.
Lors de l'utilisation d'une plaque 96 puits, s'assurer que l'orientation de la plaque est correcte. En effet, un positionnement incorrect risque d'entraîner une confusion entre les échantillons lors des analyses en aval.
6. Charger la ou les cartouches de réactifs et les consommables requis dans le tiroir des réactifs et des consommables (« Reagents and Consumables »).

Remarque : veiller à ce que les pointes de pipette soient correctement fixées.

7. Effectuer un scan des stocks du tiroir « Reagents and Consumables ».



8. Transférer **300 µl** de l'échantillon de sang total à extraire dans un microtube (2,0 ml Type H) et placer le tube dans l'adaptateur 3b 2 ml sur le portoir de tubes d'échantillons. Charger les tubes d'échantillons dans le tiroir « Samples » (échantillon).

9. À l'aide de l'écran tactile, saisir les informations requises pour chaque lot d'échantillons à traiter :

○ Informations d'échantillon : modifier le format de tube par défaut (sélectionner le bouton « Select All » [Sélectionner tout] et sélectionner « Sarstedt reference 72.694 » dans le tableau « Tube Insert » [Insert de tube])

○ Protocole à exécuter : sélectionner le bouton « Select All » (sélectionner tout) et sélectionner la catégorie « DNA Blood » (sang ADN) → Blood_200_V7_DSP pour les échantillons de sang total



○ Volume d'éluat et position de sortie : 100 µl pour le protocole sur sang total.

Remarque : une fois les informations sur le lot entrées, le statut passe de « LOADED » (Chargé) à « QUEUED » (En attente). Dès qu'un lot est mis en attente, le bouton « Run » (Analyse) apparaît.

10. Démarrer l'analyse.

○ Pour démarrer l'analyse, appuyer sur le bouton « Run » (Analyse).

○ Lire et confirmer le message qui s'affiche.

Remarque : il est recommandé d'attendre près de l'instrument jusqu'à ce qu'il ait effectué la détection du niveau de liquide des tubes de contrôle interne et que le statut du portoir du QIASymphony SP passe à « RUNNING » (Analyse en cours).

Remarque : ne pas mettre en pause ni arrêter l'analyse lors du traitement (à moins qu'une situation d'urgence se produise), car les échantillons seraient alors marqués comme « unclear » (incertains).

Remarque : il est possible de charger des échantillons de manière continue et de les ajouter à l'analyse en cours (jusqu'au chargement des réactifs). Appuyer sur le bouton « Run » (analyse) pour lancer la procédure de purification.

11. À la fin de l'exécution du protocole, le statut du lot passe de « RUNNING » (Analyse en cours) à « COMPLETED » (Terminé). Récupérer le portoir d'éluats contenant les acides nucléiques purifiés dans le tiroir « Eluate » (Éluat).

Il est recommandé de retirer la plaque d'éluats du tiroir « Eluate » (Éluat) immédiatement après la fin de l'analyse. Selon la température et l'humidité, il peut se produire de la condensation ou une évaporation sur les plaques d'éluats restant dans le QIASymphony SP après l'analyse.

Remarque : les particules magnétiques ne sont généralement pas transférées dans les éluats.

Si des particules noires apparaissent dans un éluat, il est possible d'éliminer les particules magnétiques de la façon suivante :

Appliquer au tube contenant l'ADN un séparateur magnétique approprié (par ex. QIAGEN 12-Tube Magnet, magnet à 12 tubes QIAGEN, n° réf. 36912) jusqu'à ce que les particules magnétiques soient séparées. Si l'ADN est dans des microplaques, appliquer à la microplaque un séparateur magnétique approprié (par ex. QIAGEN 96-Well Magnet Type A, magnet QIAGEN à 96 puits de type A, n° réf. 36915) jusqu'à ce que les particules magnétiques soient séparées. Si aucun séparateur magnétique n'est disponible, centrifuger le tube contenant l'ADN pendant 1 minute à pleine vitesse dans une microcentrifugeuse afin que les particules magnétiques forment un culot.

12. Exporter le fichier de résultats du QIASymphony SP : ce rapport est généré pour chaque plaque d'éluat.

- Insérer la clé USB dans l'un des ports USB sur la face avant du QIASymphony SP ;
- Cliquer sur le bouton « Tools » (Outils) ;
- Sélectionner « File Transfer » (Transfert de fichier) ;
- Dans l'onglet « In-/Output Files » (Fichiers entrants/sortants), sélectionner « Results Files » (Fichiers de résultats) et cliquer sur « Transfer » (Transfert).

Conserver le format suivant pour le nom de l'exportation du fichier : aaaa-mm-jj hh:mm:ss_ID du portoir d'éluats.

13. Vérifier la colonne « Validity of result » (Validité du résultat) pour chaque échantillon du fichier de résultats du QIASymphony SP

- Statut Valid (Valide) et Unclear (Incertain) : effectuer la qualification et la quantification de l'ADN
- Statut Invalid (Non valide) : l'échantillon est rejeté. Répéter l'étape d'extraction.

14. Si une cartouche de réactif est entamée, la sceller immédiatement à l'aide des bandelettes de scellage réutilisables fournies et fermer les tubes contenant la protéinase K dès le protocole terminé afin d'éviter tout risque d'évaporation.

15. Jeter les plaques et les tubes d'échantillon usagés conformément aux réglementations de sécurité locales.

16. Nettoyer le QIASymphony SP.

Suivre les instructions de maintenance des manuels d'utilisation fournis avec l'instrument.

S'assurer de nettoyer régulièrement les embouts protecteurs afin de minimiser le risque de contamination croisée.

17. Fermer les tiroirs de l'instrument et éteindre le QIASymphony SP.

Qualification et quantification de l'ADN

Un blanc de tampon AE ou ATE doit être utilisé pour étalonner le spectrophotomètre. Il est nécessaire d'utiliser ces tampons car les tampons d'élution des kits d'extraction de l'ADN génomique contiennent de l'azide de sodium comme conservateur, qui absorbe à 260 nm.

- Le rapport A_{260}/A_{280} doit être $\geq 1,7$ car un rapport inférieur indique généralement une contamination par des protéines ou la présence de produits chimiques organiques et affecte l'étape de PCR.
- La quantité d'ADN est déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm.
- Quantité totale d'ADN purifié = concentration x volume d'échantillon en μl .
- Si le rapport A_{260}/A_{280} est inférieur à 1,7 et que la concentration en ADN génomique est inférieure à 10 ng/ μl , l'échantillon ne doit pas subir d'autre traitement.

Normalisation de l'échantillon d'ADN génomique

L'ADN doit être dilué à 10 ng/ μl dans du tampon TE fourni dans le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR.

La PCR Rotor-Gene Q est optimisée pour 50 ng d'ADN génomique purifié dilué dans un volume final de 5 μl .

Protocole : qPCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Points importants avant de commencer

- Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR doit être traité sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM à l'aide du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1. Prendre le temps de se familiariser avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx avant de commencer le protocole. Consulter les manuels d'utilisation de l'instrument, de Rotor-Gene AssayManager v2.1 et du plug-in Gamma pour plus d'informations.
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 permet une interprétation automatisée des résultats de la PCR. Les paramètres du cycle sont verrouillés pour l'analyse.

À effectuer avant de commencer

Le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 doit être installé sur l'ordinateur connecté au Rotor-Gene Q et peut être téléchargé à partir du site Web de QIAGEN : www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx. Pour plus d'informations sur l'installation du logiciel principal Rotor-Gene AssayManager v2.1, consulter le *Manuel d'utilisation de l'application principale du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

- Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR requiert spécifiquement le plug-in Gamma. Ce plug-in peut être téléchargé à partir de la page suivante du site Web de QIAGEN : www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. Il doit être installé sur un ordinateur sur lequel est déjà installé le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR requiert également un profil de test. Ce profil de test (fichier .iap) contient tous les paramètres nécessaires pour la réalisation du cycle et de l'analyse du test de qPCR. Il peut être téléchargé à partir de la page du site Web de QIAGEN dédiée au kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR : www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. Le profil de test doit être importé dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Remarque : le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR ne peut être exécuté que si certains paramètres de configuration sont programmés dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager.

Pour garantir la sécurité des processus au niveau du système, les paramètres de configuration suivants doivent être définis pour le mode fermé :

- « Material number required » (Numéro de matériel requis)
- « Valid expiry date required » (Date de péremption valide requise)

- « Lot number required » (Numéro de lot requis)

Installation du plug-in Gamma et importation du profil de test

L'installation et l'importation du plug-in Gamma et du profil de test sont détaillées dans le *manuel d'utilisation de l'application principale du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1* et dans le *manuel d'utilisation du plug-in Gamma*.

- Télécharger le plug-in Gamma et la dernière version du profil de test JAK2 CE sur le site Web de QIAGEN.
- Démarrer le processus d'installation en double-cliquant sur le fichier RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi, puis en suivant les instructions d'installation. Pour obtenir une description détaillée de ce processus, se reporter à la section sur l'installation des plug-in du *manuel d'utilisation de l'application principale du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

Remarque : pour garantir la sécurité des processus au niveau du système, sélectionner l'onglet « Settings » (Paramètres) et cocher les cases « Material number required » (Numéro de matériel requis), « Valid expiry date required » (Date de péremption valide requise), « Lot number required » (Numéro de lot requis) pour le mode fermé [section Work list (liste de tâches)]. Si les cases ne sont pas activées (cochées), cliquer pour les activer.

- Une fois l'installation du plug-in effectuée avec succès, une personne disposant des droits d'administrateur pour le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 devra importer le profil de test ipsogen_JAK2_blood_CE de la façon suivante :
 1. Se connecter au logiciel Rotor-Gene AssayManager en tant qu'utilisateur disposant des droits d'administrateur.
 2. Sélectionner l'environnement de configuration.
 3. Sélectionner l'onglet « Assay Profiles » (Profils de test).
 4. Cliquer sur le bouton « Import » (Importer).
 5. Sélectionner le profil de test ipsogen_JAK2_blood_CE à importer dans la boîte de dialogue et cliquer sur « Open » (Ouvrir).
 6. Une fois le profil de test importé avec succès, il peut être utilisé dans l'environnement « Setup » (Configuration).

Remarque : il n'est pas possible d'importer deux fois la même version d'un profil de test.

Traitement des échantillons sur les instruments Rotor-Gene Q MDx avec rotor à 72 tubes

Il est recommandé de tester au moins huit échantillons d'ADN génomique au cours de la même expérience pour optimiser l'utilisation des contrôles, des standards et des mélanges réactionnels.

Le tableau 2 indique le nombre de réactions pouvant être analysées avec le rotor à 72 tubes.

Le schéma indiqué à la figure 3 fournit un exemple de configuration du bloc de chargement ou du rotor pour un test avec le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR.

Les chiffres indiquent les positions dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor.

Tableau 2. Nombre de réactions pour les instruments Rotor-Gene Q MDx avec rotor à 72 tubes

| Échantillons | Nombre de réactions |
|--|---------------------|
| Avec le mélange réactionnel JAK2 MT | |
| 8 échantillons d'ADN génomique | 8 |
| Standards quant. JAK2 MT | 4 |
| Contrôle JAK2 MT (mutant) | 1 |
| Contrôle JAK2 WT (sauvage) | 1 |
| Eau pour NTC (contrôle négatif) | 1 |
| Avec le mélange réactionnel JAK2 WT | |
| 8 échantillons d'ADN génomique | 8 |
| Standards quant. JAK2 WT (sauvage) | 4 |
| Contrôle JAK2 MT (mutant) | 1 |
| Contrôle JAK2 WT (sauvage) | 1 |
| Water for NTC (eau pour NTC) | 1 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------|----|------|----|----|----|----|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|
| 1 | WT QS1 | 9 | MT C | 17 | S2 | 25 | S6 | 33 | ○ | 41 | ○ | 49 | ○ | 57 | ○ | 65 | ○ |
| 2 | MT QS1 | 10 | MT C | 18 | S2 | 26 | S6 | 34 | ○ | 42 | ○ | 50 | ○ | 58 | ○ | 66 | ○ |
| 3 | WT QS2 | 11 | WT C | 19 | S3 | 27 | S7 | 35 | ○ | 43 | ○ | 51 | ○ | 59 | ○ | 67 | ○ |
| 4 | MT QS2 | 12 | WT C | 20 | S3 | 28 | S7 | 36 | ○ | 44 | ○ | 52 | ○ | 60 | ○ | 68 | ○ |
| 5 | WT QS3 | 13 | NT C | 21 | S4 | 29 | S8 | 37 | ○ | 45 | ○ | 53 | ○ | 61 | ○ | 69 | ○ |
| 6 | MT QS3 | 14 | NT C | 22 | S4 | 30 | S8 | 38 | ○ | 46 | ○ | 54 | ○ | 62 | ○ | 70 | ○ |
| 7 | WT QS4 | 15 | S1 | 23 | S5 | 31 | ○ | 39 | ○ | 47 | ○ | 55 | ○ | 63 | ○ | 71 | ○ |
| 8 | MT QS4 | 16 | S1 | 24 | S5 | 32 | ○ | 40 | ○ | 48 | ○ | 56 | ○ | 64 | ○ | 72 | ○ |

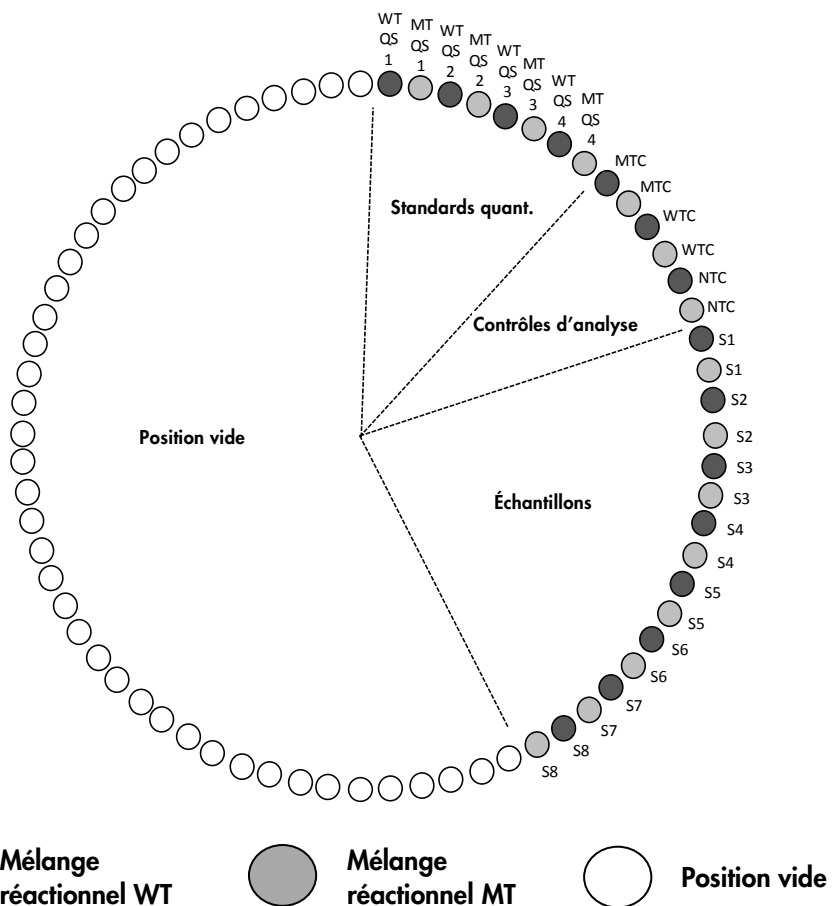


Figure 3. Configuration de plaque et de rotor pour une expérience avec le kit *ipsogen* JAK2 RGGQ PCR. WTC : contrôle JAK2 WT ; MTC : contrôle JAK2 MT ; WT-QS : standards JAK2 WT ; MT-QS : standards quant. JAK2 MT ; S : échantillon d'ADN génomique ; NTC : No Template Control ou contrôle négatif (eau).



Les tubes doivent être insérés dans le rotor comme indiqué à la Figure 3 étant donné que l'analyse automatisée configurée dans le profil de test repose sur cette organisation. Une disposition différente risque d'entraîner des résultats aberrants

Remarque : compléter toutes les autres positions avec des tubes vides.

qPCR sur les instruments Rotor-Gene Q MDx avec rotor à 72 tubes

1. Créer une liste de tâches pour les échantillons à traiter de la façon suivante.

- Allumer l'instrument Rotor-Gene Q MDx.
- Ouvrir le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 et se connecter en tant qu'utilisateur avec un rôle d'opérateur en mode fermé.
- Cliquer sur le bouton « New work list » (Nouvelle liste de tâches) dans le gestionnaire des listes de tâches [environnement « Setup » (Configuration)].
- Sélectionner « JAK2 CE assay profile » (Profil de test JAK2 CE) dans la liste des profils de test disponibles dans l'étape de test.
- Cliquer sur le bouton « Move » (Déplacer) pour transférer le profil de test sélectionné vers la liste « Selected assay profiles » (Profils de test sélectionnés). Le profil de test doit maintenant s'afficher dans la liste « Selected assay profiles » (Profils de test sélectionnés).
- Saisir le nombre d'échantillons dans le champ correspondant.
- Saisir les informations suivantes concernant le kit JAK2, imprimées sur le couvercle de la boîte :
 - Numéro de matériel : 1079182
 - Date de péremption valide
 - Numéro de lot.Le code-barres du kit peut également être lu ou saisi manuellement.
- Sélectionner l'étape « Samples » (Échantillons). Une liste contenant les détails des échantillons apparaît. Cette liste représente la disposition attendue du rotor.
- Saisir le(s) numéro(s) d'identification du ou des échantillons dans la liste ainsi que les éventuelles informations optionnelles sur les échantillons sous la forme d'un commentaire pour chaque échantillon.
- Sélectionner l'étape « Properties » (Propriétés) et saisir un nom de liste de tâches.
- Cocher la case « is applicable » (s'applique).
- Enregistrer la liste de tâches.
- Il est possible d'imprimer la liste de tâches. Ceci pourra s'avérer utile lors de la préparation et de la configuration de la qPCR. Pour imprimer la liste de tâches, appuyer sur le bouton « Print work list » (Imprimer liste de tâches). Les détails sur les échantillons sont inclus dans cette liste de tâches.

Remarque : il est possible de créer la liste de tâches après avoir configuré le test sur l'instrument ou avant d'ajouter les échantillons dans l'instrument, étant donné que le fichier de la liste de tâches peut être enregistré.

2. Configurer le test de qPCR.

- Décongeler tous les composants nécessaires à l'exception de la Taq ADN polymérase, qui doit être maintenue au congélateur lorsqu'elle n'est pas utilisée. Placer les tubes contenant les composants à décongeler sur de la glace.

Remarque : l'étape de décongélation ne doit pas dépasser 30 minutes afin d'éviter toute dégradation du matériel.

- Nettoyer la zone de la paillasse dédiée à la préparation du mélange pour PCR afin d'éviter toute contamination de matrice ou de nucléase.
- Mélanger doucement en retournant 10 fois les tubes contenant les standards, les contrôles et les mélanges réactionnels et les centrifuger brièvement avant utilisation..

3. Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à tester.

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Tableau 3 et Tableau 4 décrivent le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs MT et d'un mélange de réactifs WT calculés pour obtenir un volume réactionnel final de 25 µl. Un volume supplémentaire est inclus afin de compenser toute erreur de pipetage et permettre de tester 8 échantillons en plus des contrôles.

Tableau 3. Préparation des mélanges de qPCR pour la détection de la séquence JAK2 mutant

| Composant | 1 réaction (µl) | 15 +1* réactions (µl) | Concentration finale |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|
| Mélange réactionnel JAK2 MT | 19,8 | 316,8 | 1x |
| Taq ADN polymérase | 0,2 | 3,2 | 1x |
| Échantillon (à ajouter à l'étape 4) | 5 | 5 chacun | - |
| Volume total | 25 | 25 chacun | - |

* Un volume réactionnel supplémentaire est inclus en tant que volume mort.

Tableau 4. Preparation of qPCR mixes for JAK2 WT sequence detection

| Composant | 1 réaction (µl) | 15 +1* réactions (µl) | Concentration finale |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|
| Mélange réactionnel JAK2 WT | 19,8 | 316,8 | 1x |
| Taq ADN polymérase | 0,2 | 3,2 | 1x |
| Échantillon (à ajouter à l'étape 4) | 5 | 5 chacun | - |
| Volume total | 25 | 25 chacun | - |

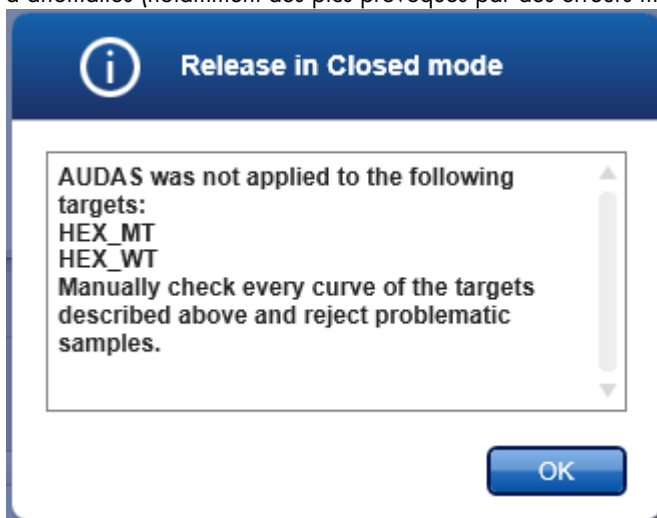
* Un volume réactionnel supplémentaire est inclus en tant que volume mort.

- Passer à l'agitateur vortex et centrifuger brièvement avant de distribuer 20 µl du pré-mélange de qPCR par barrette de tubes.

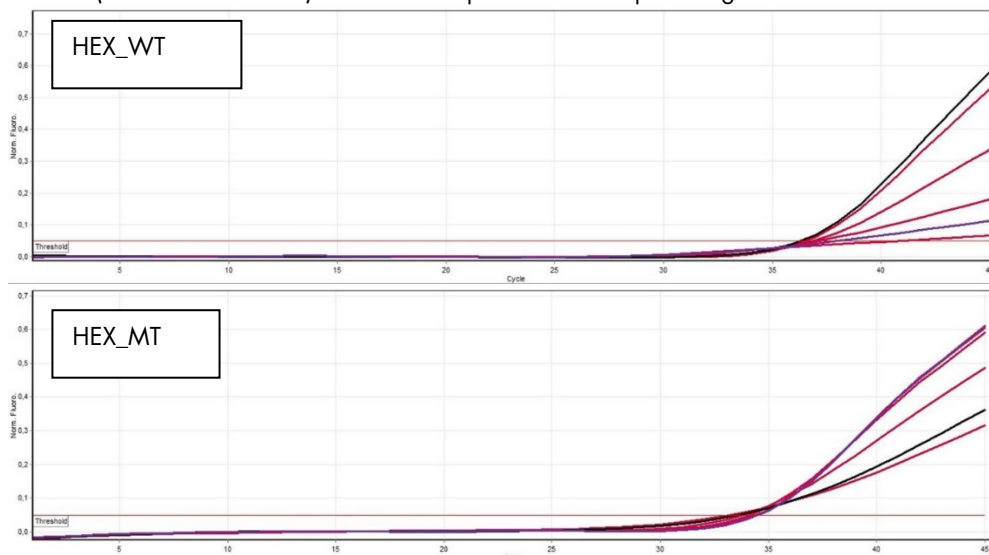
- Passer à l'agitateur vortex et centrifuger brièvement l'ADN (échantillons d'ADN génomique plus les QS et les contrôles). Ajouter ensuite 5 µl de matériel à quantifier dans le tube correspondant afin d'obtenir un volume total de 25 µl. Mélanger doucement en pipetant.
 - **Remarque :** veiller à changer de pointe entre chaque tube afin d'éviter toute contamination avec une matrice non spécifique ou un mélange réactionnel, ce qui entraînerait des résultats faux positifs.
 - Remettre tous les composants du kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR au congélateur afin d'éviter toute dégradation des matériels.
4. Préparer le Rotor-Gene Q MDx et démarrer le test comme suit.
- Placer un rotor à 72 puits sur le support de rotor Rotor-Gene Q MDx.
 - Remplir le rotor avec les barrettes de tubes conformément aux positions attribuées, en commençant par la position 1, comme indiqué sur la Figure 3, une barrette de tubes vides et bouchés positionnée à toutes les positions non utilisées.
 - **Remarque :** veiller à ce que le premier tube soit inséré en position 1 et que l'orientation et les positions des barrettes de tubes soient correctes, comme indiqué sur la Figure 3.
 - Fixer la bague de fermeture.
 - Charger le rotor avec la bague de fermeture sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx, puis fermer le couvercle de l'instrument.
 - Dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1, sélectionner la liste de tâches correspondante dans le gestionnaire de listes de tâches et cliquer sur le bouton « Apply » (Appliquer) ou, si la liste de tâches est encore ouverte, cliquer sur le bouton « Apply » (Appliquer).
 - **Remarque :** si la liste de tâches dédiée au test n'a pas encore été créée, se connecter au logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 et suivre l'étape 2 avant de poursuivre comme suit.
 - Saisir le nom du test.
 - Sélectionner le thermo-cycleur à utiliser dans « Cyclers selection » (Sélection du thermo-cycleur).
 - Vérifier que la bague de fermeture est bien fixée et le confirmer à l'écran.
 - Cliquer sur le bouton « Start run » (Démarrer l'analyse).
 - Le test JAK2 RGQ PCR doit démarrer.
5. Procéder comme suit pour mettre fin à l'analyse.
- Lorsque le test est terminé, cliquer sur « Finish run » (Terminer l'analyse).
 - Accepter et approuver l'analyse :
 - Pour les utilisateurs connectés avec un rôle « Approuver » (Approbateur) : cliquer sur « Release and go to approval » (Valider et passer à l'approbation).
 - Pour les utilisateurs connectés avec un rôle « Operator » (Opérateur) : cliquer sur « Release » (Valider).

6. Valider les résultats.

- Si l'opérateur a cliqué sur « Release and go to approval » (Valider et passer à l'approbation), les résultats du test s'affichent.
- L'alerte AUDAS (Lecture de données automatique) suivante apparaît. Contrôler manuellement les cibles HEX dans la section « Plots and Information » (Tracés et informations) des courbes de données brutes pour vérifier qu'elles ne comportent pas d'anomalies (notamment des pics provoqués par des erreurs matérielles).



Noter que les courbes des cibles HEX de contrôle interne ne présentent généralement pas de formes sigmoïdes (comme dans les exemples de courbes ci-dessous) et doivent être considérées comme des courbes valides. Noter que tous les autres critères de validité internes (comme les seuils C_T) sont automatiquement vérifiés par le logiciel.



- Si un utilisateur avec un rôle « Operator » (Opérateur) a cliqué sur « Release » (Valider), une personne avec un rôle « Approver » (Approbateur) devra se connecter et sélectionner l'environnement « Approval » (Approbation).
 - Filtrer le test à approuver en sélectionnant les options de filtrage puis en cliquant sur le bouton « Apply » (Appliquer).
 - L'alerte AUDAS (Lecture de données automatique) ci-dessus apparaît. Contrôler manuellement les cibles HEX dans la section « Plots and Information » (Tracés et informations) des courbes de données brutes pour vérifier qu'elles ne comportent pas d'anomalies (notamment des pics provoqués par des erreurs matérielles).
 - Noter que les courbes des cibles HEX de contrôle interne ne présentent généralement pas de formes sigmoïdes (comme dans les exemples de courbes ci-dessus) et doivent être considérées comme des courbes valides. Noter que tous les autres critères de validité internes (comme les seuils C_T) sont automatiquement vérifiés par le logiciel.
 - Examiner les résultats et cliquer sur le bouton « Release/Report data » (Valider les données/Rapport).
 - Cliquer sur « OK ». Le rapport sera généré au format .pdf et sera enregistré automatiquement dans le dossier prédéfini.

Par défaut, le chemin d'accès à ce dossier est le suivant :

QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Remarque : il est possible de modifier ce chemin d'accès ainsi que le dossier dans l'environnement « Configuration ».

Remarque : pour le dépannage, il est nécessaire de disposer d'un support technique pour le test. Il est possible de générer les solutions de support technique dans l'environnement « Approval » (Approbation) ou « Archive » (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* [Manuel d'utilisation de l'application principale Rotor-Gene AssayManager v2.1], section « Troubleshooting » [Dépannage] > « Creating a support package » [Création d'un support technique]). En outre, il pourra être utile de disposer de la piste d'audit à partir de l'incident ± 1 jour. La piste d'audit peut être récupérée dans l'environnement « Service » (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* [Manuel d'utilisation de l'application principale Rotor-Gene AssayManager v2.1], section 1.5.5.5).

7. Télécharger l'instrument Rotor-Gene Q MDx et jeter les tubes en barrettes conformément aux réglementations de sécurité locales.

Interprétation des résultats

L'analyse est entièrement automatisée.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyse d'abord* les courbes d'amplification et peut invalider des courbes non conformes, en fonction de leur forme et de l'amplitude du bruit. Si tel est le cas, un avertissement est associé à la courbe invalidée.

Les résultats des échantillons de test sont analysés et définis automatiquement par le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1, mais ils doivent être approuvés et validés par l'utilisateur connecté avec le rôle « Approuver » (approbateur). La présence de trois boutons d'approbation supplémentaires à la fin de la ligne dédiée à un échantillon indique que les résultats de cet échantillon doivent être approuvés. Ces boutons servent à accepter ou à rejeter les résultats des échantillons. Pour plus d'informations, se reporter au Gamma Plug-in User Manual (manuel d'utilisation du plug-in Gamma).

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyse ensuite les contrôles d'analyse :

- NTC permet de vérifier l'absence d'amplification spécifique (JAK2 WT et JAK2 MT) et la présence d'une amplification du contrôle interne.
- WT QS et MT QS : la validation repose sur les valeurs de R^2 et de la pente pour chacun des deux contrôles.
- WTC : le nombre total de copies JAK2 (TCN) doit être suffisamment élevé pour que ce contrôle puisse être interprété. Si tel est le cas, le pourcentage de mutation JAK2 sera calculé. Ce contrôle d'analyse est validé si son statut est WT d'après le test.
- MTC : le nombre total de copies JAK2 doit être suffisamment élevé pour que ce contrôle puisse être interprété. Si tel est le cas, le pourcentage de mutation JAK2 sera calculé. Ce contrôle d'analyse est validé si son statut est hautement positif pour la mutation JAK2.

Remarque : le rapport généré à la fin de l'analyse indique les résultats obtenus pour les contrôles d'analyse, les avertissements invalidants étant indiqués en regard des données non valides.

Si tous les contrôles de l'analyse sont conformes, Rotor-Gene AssayManager v2.1 analysera les échantillons inconnus.

* Activation pour les cibles FAM uniquement.

- Dans l'échantillon, le nombre total de copies doit être suffisamment élevé pour que les résultats puissent être interprétés. Le pourcentage de mutation JAK2 sera alors calculé et le résultat sera donné. Si aucune amplification spécifique n'est observée dans un tube (WT ou MT), l'amplification du contrôle interne sera vérifiée afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un artefact. Au moins une valeur CT doit être observée dans chaque tube (WT et MT) pour qu'un échantillon puisse être validé par Rotor-Gene AssayManager et pour que le résultat correspondant soit valide.

Remarque : si les contrôles d'analyse et les résultats des échantillons sont valides, le rapport indiquera le nombre de copies et le pourcentage de mutation en regard de chaque échantillon.

- Le tableau 5 rassemble les avertissements invalidants pour les échantillons qui peuvent être attribués à un tube donné lors de l'analyse par Rotor-Gene AssayManager v2.1, ainsi qu'une explication de leur signification.

Le tableau 6 (page 37) décrit les avertissements pour les échantillons et offre une description des termes utilisés.

Tableau 5. Avertissements invalidants pour les échantillons et description des termes

| Message | Description |
|-----------------------------|--|
| ANALYSIS_FAILED | Le test apparaît comme invalide car l'analyse a échoué. Contacter les services techniques de QIAGEN. |
| ASSAY_INVALID | Le test est invalide car au moins un contrôle externe n'est pas valide. |
| CONSECUTIVE_FAULT | Une cible utilisée pour le calcul de cette cible n'est pas valide. |
| CURVE_SHAPE_ANOMALY | La courbe d'amplification des données brutes dévie par rapport au comportement établi pour ce test. La probabilité de résultats incorrects ou d'une mauvaise interprétation est très élevée. |
| FLAT_BUMP | La courbe d'amplification des données brutes présente une bosse plate qui dévie par rapport au comportement établi pour ce test. La probabilité de résultats incorrects ou d'une mauvaise interprétation est très élevée (par ex. détermination de la valeur de C_T fausse). |
| INVALID_CALCULATION | Le calcul a échoué pour cette cible. |
| MC_IC_HIGH_CT (WT) | La valeur de C_T détectée est plus élevée que prévu pour un contrôle interne dans le même tube que le contrôle mutant avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| MC_IC_LOW_CT (WT) | La valeur de C_T détectée est plus faible que prévu pour un contrôle interne dans le même tube que le contrôle mutant avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| MC_IC_NO_CT (MT) | Aucun C_T détectable pour le contrôle interne dans le même tube que le contrôle mutant avec le mélange réactionnel mutant. |
| MC_IC_NO_CT (WT) | Aucun C_T détectable pour le contrôle interne dans le même tube que le contrôle mutant avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| MC_LOW_CN | Le nombre de copies du contrôle mutant est trop faible. |
| MC_LOW_PERCENTAGE | Le pourcentage de mutation du contrôle mutant est trop faible. |
| MC_NO_CN | Aucun nombre de copies pour le contrôle mutant. |
| MC_NO_CT (MT) | Pas de C_T détectable pour le contrôle mutant avec le mélange réactionnel mutant. |
| MC_NO_VALUE | Le pourcentage de mutation du contrôle mutant n'a pas de valeur. |
| MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING | La courbe d'amplification dépasse plusieurs fois le seuil. Il est impossible de déterminer un C_T non équivoque. |
| NO_BASELINE | Aucune ligne de base n'a été trouvée. L'analyse suivante ne peut pas être effectuée. |
| NTC_IC_HIGH_CT (MT) | La valeur de C_T détectée est plus élevée que prévu pour un contrôle interne dans le même tube que le contrôle négatif avec le mélange réactionnel mutant. |
| NTC_IC_HIGH_CT (WT) | La valeur de C_T détectée est plus élevée que prévu pour un contrôle interne dans le même tube que le contrôle négatif avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| NTC_IC_NO_CT (MT) | Aucun C_T détectable pour le contrôle interne dans le même tube que le contrôle négatif avec le mélange réactionnel mutant. |
| NTC_IC_NO_CT (WT) | Aucun C_T détectable pour le contrôle interne dans le même tube que le contrôle négatif avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| NTC_IC_LOW_CT (MT) | La valeur de C_T détectée est plus faible que prévu pour un contrôle interne dans le même tube que le contrôle négatif avec le mélange réactionnel mutant. |
| NTC_IC_LOW_CT (WT) | La valeur de C_T détectée est plus faible que prévu pour un contrôle interne dans le même tube que le contrôle négatif avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| NTC_UNEXPECTED_VALUE | Des C_T ont été détectés dans le contrôle négatif. |

| Message | Description |
|--------------------------|--|
| OTHER_TARGET_INVALID | Une autre cible du même échantillon est non valide. |
| OUT_OF_COMPUTATION_RANGE | La concentration calculée pour cet échantillon dépasse la limite technique. |
| QS_HIGH_SLOPE (MT) | La limite supérieure de la pente mutante est dépassée. |
| QS_HIGH_SLOPE (WT) | La limite supérieure de la pente de type sauvage est dépassée. |
| QS_IC_NO_CT (WT) | Aucun C _T détectable pour le contrôle interne dans le même tube qu'un ou plusieurs des standards de quantification de type sauvage. |
| QS_LOW_SLOPE (MT) | La limite inférieure de la pente mutante n'est pas atteinte. |
| QS_LOW_SLOPE (WT) | La limite inférieure de la pente de type sauvage n'est pas atteinte. |
| QS_LOW_RSQUARED (MT) | La limite inférieure du R ² mutant n'est pas atteinte. |
| QS_LOW_RSQUARED (WT) | La limite inférieure du R ² de type sauvage n'est pas atteinte. |
| QS_NO_CT (MT) | Aucun C _T détectable pour un ou plusieurs standards de quantification de type mutant. |
| QS_NO_CT (WT) | Aucun C _T détectable pour un ou plusieurs standards de quantification de type sauvage. |
| RUN_FAILED | Le test apparaît comme invalide en raison d'un problème avec le thermocycleur ou la connexion du thermocycleur. |
| RUN_STOPPED | Le test apparaît comme invalide car l'analyse a été arrêtée manuellement. |
| SAMPLE_LOW_CN | Le nombre de copies pour un échantillon de test est trop faible. |
| SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT | La valeur de C _T détectée est plus élevée que prévu pour un contrôle interne dans le même tube qu'un échantillon de test avec le mélange réactionnel mutant. |
| SAMPLE_MT_IC_LOW_CT | La valeur de C _T détectée est plus faible que prévu pour un contrôle interne dans le même tube qu'un échantillon de test avec le mélange réactionnel mutant. |
| SAMPLE_MT_IC_NO_CT | Aucun C _T détectable pour le contrôle interne dans le même tube qu'un échantillon avec le mélange réactionnel mutant. |
| SAMPLE_NO_CN | Aucun nombre de copies pour un échantillon de test. |
| SAMPLE_NO_VALUE | Le pourcentage de mutation d'un échantillon de test n'a pas de valeur. |
| SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT | La valeur de C _T détectée est plus élevée que prévu pour un contrôle interne dans le même tube qu'un échantillon de test avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| SAMPLE_WT_IC_LOW_CT | La valeur de C _T détectée est plus faible que prévu pour un contrôle interne dans le même tube qu'un échantillon de test avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| SAMPLE_WT_IC_NO_CT | Aucun C _T détectable pour le contrôle interne dans le même tube qu'un échantillon avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| SATURATION | La fluorescence sur les données brutes est fortement saturée avant le point d'inflexion de la courbe d'amplification. |
| SPIKE_CLOSE_TO_CT | Une pointe est détectée dans la courbe d'amplification à proximité de la valeur de C _T . |
| STEEP_BASELINE | Une ligne de base présentant une forte montée est détectée dans la fluorescence sur les données brutes de la courbe d'amplification. |
| STRONG_BASELINE_DIP | Une ligne de base présentant une forte chute est détectée dans la fluorescence sur les données brutes de la courbe d'amplification. |
| STRONG_NOISE | Détection d'un bruit de fond élevé en-dehors de la phase de croissance sur la courbe d'amplification. |

| Message | Description |
|------------------------------|---|
| STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE | Détection d'un bruit de fond élevé pendant la phase de croissance (exponentielle) sur la courbe d'amplification. |
| WAVY_BASE_FLUORESCENCE | Une ligne de base présentant une ondulation est détectée dans la fluorescence sur les données brutes de la courbe d'amplification. |
| WTC_HIGH_PERCENTAGE | Le pourcentage de mutation du contrôle de type sauvage est trop élevé. |
| WTC_IC_HIGH_CT (MT) | La valeur de C _T détectée est plus élevée que prévu pour un contrôle interne dans le même tube que le contrôle de type sauvage avec le mélange réactionnel mutant. |
| WTC_IC_LOW_CT (MT) | La valeur de C _T détectée est plus faible que prévu pour un contrôle interne dans le même tube que le contrôle de type sauvage avec le mélange réactionnel mutant. |
| WTC_IC_NO_CT (MT) | Aucun C _T détectable pour le contrôle interne dans le même tube que le contrôle de type sauvage avec le mélange réactionnel mutant. |
| WTC_IC_NO_CT (WT) | Aucun C _T détectable pour le contrôle interne dans le même tube que le contrôle de type sauvage avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| WTC_LOW_CN | Le nombre de copies du contrôle de type sauvage est trop faible. |
| WTC_NO_CT (WT) | Pas de C _T détectable pour le contrôle de type sauvage avec le mélange réactionnel de type sauvage. |
| WTC_NO_CN | Aucun nombre de copies pour le contrôle de type sauvage. |
| WTC_NO_VALUE | Le pourcentage de mutation du contrôle de type sauvage n'a pas de valeur. |

Tableau 6. Avertissements pour les échantillons et description des termes

| Message | Description |
|-------------------------|--|
| LOW_FLUORESCENCE_CHANGE | Le pourcentage de modification de la fluorescence pour cet échantillon par rapport au tube échantillon ayant la plus forte modification de la fluorescence est inférieur à une limite définie. |
| LOW_REACTION_EFFICIENCY | L'efficacité de la réaction pour cet échantillon n'a pas atteint de limite définie. |
| SPIKE | Une pointe dans la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification mais en dehors de la zone où la valeur de C _T est déterminée. |

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, consulter également la page de foire aux questions dans notre Centre de support technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les techniciens de QIAGEN sont toujours heureux de répondre aux questions concernant les informations et les protocoles contenus dans ce manuel ou à propos des technologies d'échantillonnage et de dosage (pour les coordonnées, voir « Coordonnées » page 47).

Pour des informations sur le dépannage des kits d'extraction QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n° réf. 61104) et QIASymphony DNA DSP Mini Kit (n° réf. 937236), consulter les manuels correspondants.

Commentaires et suggestions

Extraction automatisée

| | |
|--|---|
| Échantillon signalé en tant que « unclear » (incertain) | Ceci peut être dû à une pause lors de l'extraction. Si l'extraction s'est achevée, passer à l'étape du rapport de DO et de la mesure de la concentration. Dans le cas contraire, répéter l'extraction. |
| Échantillon signalé en tant que « unprocessed » (non traité) | Ceci fait référence à une erreur dans le volume initial de l'échantillon. Vérifier le volume de sang par pipetage. Si le volume est trop faible, l'augmenter de façon que l'échantillon fasse 300 µl et redémarrer l'analyse. |
| Échantillon signalé en tant que « invalid » (non valide) | Une erreur s'est produite lors de l'extraction. Répéter l'étape d'extraction pour cet échantillon. |
| Erreur de température du bloc de refroidissement | Un message d'erreur à la fin de l'analyse concernant la température de refroidissement signifie que les échantillons sont restés à température ambiante (entre 15 et 25 °C) depuis la fin de l'extraction. Si les échantillons sont restés à température ambiante pendant une durée < 12 heures, la qualité de l'ADN génomique ne devrait pas être altérée et l'ADN génomique peut être quantifié. Si la durée est > 12 heures, les échantillons d'ADN génomique se sont peut-être dégradés. Si tel est le cas, répéter l'extraction. |
| Erreur de retrait de la plaque d'élution | À la fin de l'analyse, un message d'erreur peut s'afficher si la plaque d'élution a été retirée sans vérification de l'opération appropriée à l'écran. Ceci peut être corrigé en cliquant sur la case appropriée. |

Manipulation générale pour l'évaluation du statut de la mutation JAK2 à l'aide du kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR

Le nombre total de copies n'est pas conforme et l'échantillon correspondant est non valide : l'amplification est trop faible

- | | |
|---|--|
| a) Vérifier le rapport A_{260}/A_{280} | S'il est < 1,7, effectuer une nouvelle extraction de l'ADN. |
| b) Vérifier la concentration en ADN | Le kit <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR est optimisé pour une concentration de travail de 10 ng/µl. Si la concentration en ADN est différente, diluer ou refaire l'extraction de l'ADN à partir de sang total. |
| c) Si les deux paramètres sont conformes, il est possible que les volumes pipetés soient incorrects | Vérifier et réétalonner les pipettes avant de répéter l'étape de qPCR. |

Commentaires et suggestions

Échec du contrôle d'analyse sur un standard QS

- | | |
|---|--|
| a) Inversion de tubes | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. |
| b) Inversion lors de la distribution | Stocker le contenu du kit entre -30 et -15 °C et conserver les mélanges réactionnels à l'abri de la lumière. |
| c) Contamination croisée | Éviter les cycles congélation-décongélation. |
| d) Dégradation partielle des standards | |
| e) Réactifs de PCR partiellement dégradés | |
| f) Amplification non spécifique | |

Signal nul ou de faible intensité pour un échantillon standard

- | | |
|--|--|
| a) Problème de distribution | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. |
| b) Utilisation du même mélange réactionnel pour WT QS et MT QS | Répéter l'expérience de PCR. |

Le NTC (No Template Control, contrôle négatif) d'H₂O est positif

- | | |
|------------------------------------|--|
| a) Contamination croisée | Remplacer tous les réactifs critiques. |
| b) Contamination des réactifs | Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables en accord avec les pratiques communément admises pour prévenir les contaminations croisées. |
| c) Inversion de barrettes de tubes | Conserver les mélanges réactionnels à l'abri de la lumière. |
| d) Dégradation de la sonde | Vérifier les faux positifs sur la courbe de fluorescence. |

Aucun signal, même avec les contrôles standards

- | | |
|-------------------------------------|--|
| Erreur de pipetage ou réactifs omis | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Répéter l'expérience de PCR. |
|-------------------------------------|--|

Signaux faibles ou absents pour les échantillons mais les contrôles sont OK

- | | |
|---|---|
| Effets inhibiteurs du matériel de l'échantillon dus à une purification insuffisante | Toujours vérifier la qualité de l'ADN en mesurant le rapport A_{260}/A_{280} et la concentration avant analyse. Recommencer la préparation de l'ADN. |
|---|---|

Le WTC (Wild-type Control, contrôle de type sauvage) est positif, mais le MTC (Mutant Control, contrôle mutant) n'est pas assez positif

- | | |
|-----------------------|--|
| Contamination croisée | Remplacer tous les réactifs critiques. Recommencer l'expérience avec de nouvelles aliquotes de tous les réactifs. Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables en accord avec les pratiques communément admises pour prévenir les contaminations croisées. Veiller à changer de pointes de pipette entre chaque réactif lors du pipetage. |
|-----------------------|--|

Signal du WTC (Wild-type Control, contrôle de type sauvage) ou du MTC (Mutant Control, contrôle mutant) utilisant les mélanges réactionnels réciproques

- | | |
|-------------------------------|--|
| a) Contamination croisée | Remplacer tous les réactifs critiques. |
| b) Contamination des réactifs | Recommencer l'expérience avec de nouvelles aliquotes de tous les réactifs. |
| c) Inversion de tubes | Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables en accord avec les pratiques communément admises pour prévenir les contaminations croisées. Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. |

Détection inversée du contrôle positif

- | | |
|--|--|
| a) Contamination croisée | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. |
| b) Inversion de distribution du mélange réactionnel dans le tube ou le pré-mélange | |

Aucun signal pour un échantillon ou un contrôle, même pour le contrôle interne

Commentaires et suggestions

| | |
|-----------------------------------|---|
| a) Mélange réactionnel non ajouté | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Si le contrôle interne n'est pas amplifié, le mélange réactionnel n'a pas été ajouté ou est dégradé. |
| b) Mélange réactionnel dégradé | Répéter l'étape de qPCR avec un nouveau mélange réactionnel. |

Remarque : si le problème ne peut être attribué à aucune des causes ci-dessus ou que les actions correctives suggérées ne résolvent pas le problème, prière de contacter le Service technique de QIAGEN afin de demander conseil.

Contrôle qualité

Le contrôle qualité de l'ensemble du kit a été effectué sur un instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Ce kit a été fabriqué en accord avec la norme ISO 13485:2012. Le certificat d'analyse est disponible sur demande à l'adresse suivante : www.qiagen.com/support/.

Limitations

Ce kit est réservé à un usage professionnel.

Le produit est destiné à être utilisé uniquement par le personnel ayant reçu les instructions et la formation spécialement liées aux techniques de biologie moléculaires et étant familiarisé avec cette technologie.

Ce kit doit être utilisé selon les instructions données dans ce manuel, en combinaison avec les instruments validés mentionnés sous « Matériel nécessaire mais non fourni », page 10.

Il est important de respecter les dates de péremption imprimées sur l'étiquette de la boîte. Ne pas utiliser de composants périmés.

Tous les réactifs fournis dans le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit. Le non respect de cette consigne risque d'affecter les performances.

Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR est validé uniquement pour du sang total anti-coagulé dans du potassium EDTA et collecté sur des patients présentant une suspicion de SMP.

Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR n'a été validé que pour une utilisation avec le QIASymphony DNA DSP Mini Kit (n° réf. 937236) ou le QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (n° réf. 61104).

Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR n'a été validé que pour une utilisation avec les instruments Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (pour la PCR) et QIAAsymphony SP (pour la préparation des échantillons).

Toute utilisation non conforme avec les informations portées sur l'étiquetage ou la notice de ce produit et/ou modification quelconque de l'un de ses composants décharge QIAGEN de toute responsabilité.

Tous les résultats de diagnostic générés doivent être interprétés en tenant compte d'autres résultats cliniques ou de laboratoire. L'absence de la mutation JAK2 V617F/G1849T n'exclut pas la présence d'autres mutations JAK2.

L'utilisateur est responsable de la validation des performances du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN.

Caractéristiques des performances

Limite du blanc

La limite du blanc (LoB) a été déterminée d'après la norme CLSI/NCCLS EP17 2A sur des échantillons de sang total sains, ayant un statut JAK2 de type sauvage (sur 30 échantillons, 120 mesures/lot, 3 lots).

Les résultats de la LoB sont résumés dans le Tableau 7.

Tableau 7. Résumé des résultats de la LoB

| | LoB mesurée | Limite du blanc finale |
|---------------------|-------------|------------------------|
| Lot de validation 1 | 0 % | |
| Lot de validation 2 | 0 % | 0 % |
| Lot de validation 3 | 0 % | |

Limite de détection

La limite de détection (LoD ou sensibilité analytique) a été déterminée à partir de la « méthode probit » décrite dans la norme CLSI/NCCLS EP17-2A. Dans cette étude, 6 niveaux faibles de mutation ont été analysés pour 3 échantillons indépendants (ADN de sang total présentant le SMP inoculé dans de l'ADN de sang total de type sauvage), à raison de 3 lots et 60 mesures par

échantillon et par mutation. Les résultats obtenus indiquaient une sensibilité analytique de 0,042 % pour la mutation JAK2 V617F.

Les résultats de la LoD sont résumés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Résumé des résultats de LoD

| | LoD mesurée | LoD finale |
|---------------------|-------------|------------|
| Lot de validation 1 | 0,041 % | |
| Lot de validation 2 | 0,029 % | 0,042 % |
| Lot de validation 3 | 0,042 % | |

Linéarité

La linéarité de la quantification de la mutation JAK2 chez des patients atteints du SMP a été évaluée conformément à la norme CLSI/NCCLS EPO6AE, avec un lot du kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR et en testant 11 niveaux de mutation pour 5 entrées d'ADN différentes. La quantification de la charge mutationnelle JAK2 dans les échantillons de SMP est linéaire, c.-à-d. que le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR est capable de quantifier des échantillons de la valeur de la LoD jusqu'à 100 %, pourvu que la concentration de l'échantillon quantifié soit proche de 10 ng/ μ l (entre 5 et 20 ng/ μ l).

Répétabilité et reproductibilité

L'étude de la précision a été effectuée conformément à la norme CLSI/NCCLS EP5-A2. Les tests ont été réalisés sur 11 niveaux de mutation, chaque niveau a été testé en double sur 54 tests réalisées sur une période de 27 jours, ce qui a donné 108 mesures par niveau de mutation. Les résultats sont résumés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Résultats de l'étude de précision

| Échantillon | Pourcentage moyen de la mutation JAK2 | É.T. _{R+} | É.T. _{RUN++} | É.T. _{TOTAL+++} | CV _{TOTAL} |
|-------------|---------------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|
| 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 % |
| S11 | 0,007 | 0,01 | 0,002 | 0,01 | 146,84 % |

R+ : répétabilité.

AN++ : reproductibilité entre les analyses.

TOTAL+++ : précision totale (inter-instruments, inter-opérateurs et inter-lots).

CV_{TOTAL} : coefficient de variation de la précision totale (%JAK2 MT).

Substances interférentes

Le plan de l'étude reposait sur les recommandations décrites dans la norme EP7 A2 du NCCLS « Interference Testing in clinical Chemistry » (Tests d'inter-férence en chimie clinique). Un total de 17 substances potentiellement présentes dans des échantillons de sang ont été choisies pour leurs effets potentiels sur la PCR (busulfan, bromhydrate de citalopram, chlorhydrate de paroxétine semi-hydraté, chlorhydrate de sertraline, chlorhydrate de fluoxétine, acétaminophène [paracétamol], bilirubine non conjuguée, potassium EDTA, Hgb [humaine], triglycérides, lisinopril dihydraté, hydroxyurée, acide acétylsalicylique, acide salicylique, thiotepa, anagrélide, interféron alpha 2b). Les résultats obtenus n'ont montré aucun effet perturbateur pour ces substances.

Validation clinique et comparaison des méthodes

Une étude incluant 65 échantillons de sang clinique présentant le SMP a été réalisée dans deux centres cliniques français pour comparer le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR au kit *ipsogen* JAK2 MutaQuan® de QIAGEN, qui était utilisé comme méthode de référence.

Au total 65 échantillons sanguins SMP ont été congelés, décongelés, puis l'ADN génomique a été extrait. Tous les échantillons ont passé avec succès les contrôles de qualité de l'ADN pour les deux méthodes d'extraction de l'ADN génomique.

Une régression de Deming a permis de comparer les pourcentages mesurés des mutations JAK2 provenant des deux méthodes. Une forte corrélation a été obtenue entre la méthode de référence et le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR pour les échantillons avec la mutation JAK2 avec des niveaux de mutation allant de 0 % à 95 % ($R^2 = 0,969$), comme illustré à la Figure 4.

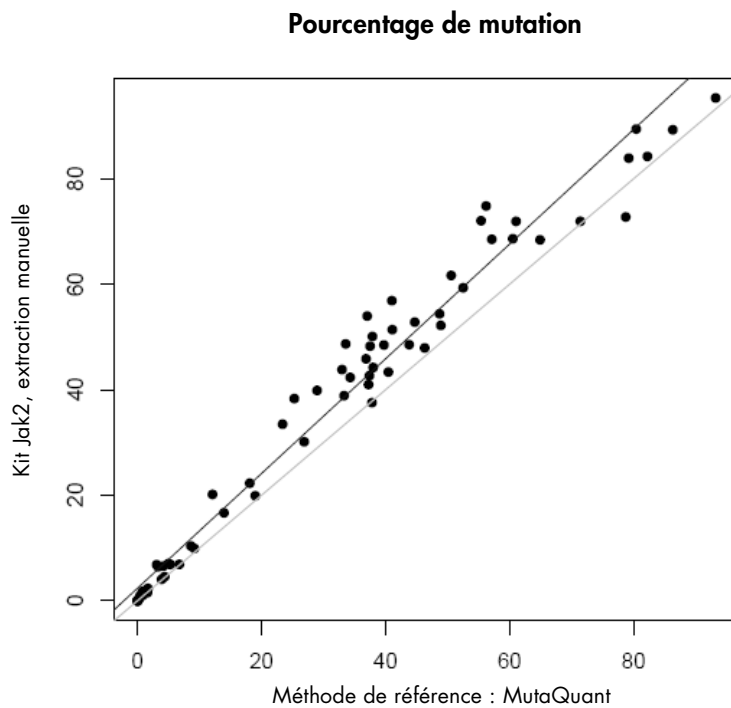


Figure 4 Tracé des pourcentages de mutation JAK2 V617F obtenus avec le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR et une méthode de référence sur les mêmes échantillons.

Les pourcentages de mutation JAK2 obtenus avec le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR étaient globalement supérieurs aux pourcentages obtenus avec la méthode de référence, ce qui met en lumière la meilleure sensibilité de ce nouveau kit (~ 1 log) (9).

Références

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. Tefferi A., et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
6. Prchal J.F. and Axelrad A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
7. 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.
8. Lippert E. et al. (2014) Clinical and biological characterization of patients with low (0.1-2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica*. **99**, e98.
9. 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.

Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquetage :



Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Numéro de référence



Numéro de lot



Numéro de matériel



Code article international (GTIN)



Limite de température



Fabricant



Conserver à l'abri de la lumière



Consulter les instructions d'utilisation



Avertissement

Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, prière de consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/support, de téléphoner au 00800-22-44-6000 ou de contacter l'un des services techniques de QIAGEN ou l'un des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Pour commander

| Produit | Contenu | N° réf. |
|--|--|---------|
| <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit (24) | Pour 24 réactions : contrôle JAK2 de type sauvage, contrôle JAK2 V617F, standards quant. JAK2 WT, standards quant. JAK2 MT, mélange réactionnel JAK2 WT, mélange réactionnel JAK2 MT, Taq DNA polymérase, tampon TE pour dilution, eau pour NTC | 673623 |
| Rotor-Gene Q MDx, pour une analyse PCR en temps réel validée par le diagnostic in vitro dans les applications cliniques | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform | Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation non comprises | 9002032 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation | 9002033 |
| Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software | Logiciel pour tests de routine utilisé en association avec le Rotor-Gene Q | 9024203 |
| Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License | Logiciel à licence unique pour une installation sur un seul ordinateur | 9025620 |
| Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes | Bloc en aluminium pour préparation de réaction manuelle avec pipette à canal unique dans des tubes de 72 x 0,1 ml | 9018901 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) | 250 barrettes de 4 tubes et capuchons pour 1 000 réactions | 981103 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500) | 10 x 250 barrettes de 4 tubes et capuchons pour 10 000 réactions | 981106 |
| QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit | Pour 50 préparations : colonnes QIAamp Mini Spin, tampons, réactifs, tubes, VacConnectors | 61104 |
| QIAsymphony DSP DNA Mini Kit | Pour 192 préparations de 200 µl chacune : comprend 2 cartouches de réactifs ainsi que des supports d'enzymes et des accessoires | 937236 |
| QIAsymphony SP et accessoires | | |
| QIAsymphony SP System | Module de préparation des échantillons du système QIAsymphony : installation et formation comprises, garantie d'un an, pièces et main-d'œuvre | 9001751 |
| QIAsymphony SP | Module de préparation des échantillons du système QIAsymphony : inclut une garantie d'un an, pièces et main-d'œuvre | 9001297 |
| Sample Prep Cartridges, 8-well (336) | Cartouches de préparation d'échantillons à 8 puits pour une utilisation avec le système QIAsymphony SP | 997002 |
| 8-Rod Covers (144) | Manchons pour 8 barreaux pour une utilisation avec le système QIAsymphony SP | 997004 |
| Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024) | Embouts à filtre jetables, en portoirs (8 x 128), pour une utilisation avec le QIAcube® et les instruments QIAsymphony SP/AS | 990332 |
| Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024) | Embouts à filtre jetables, en portoirs (8 x 128), pour une utilisation avec les instruments QIAsymphony SP/AS | 997024 |
| Elution Microtubes CL (24 x 96) | Tubes de polypropylène non stériles (capacité maximale 0,85 ml, capacité de stockage moins de 0,7 ml, capacité d'éluion 0,4 ml), 2 304 en portoirs de 96, barrettes de capuchons comprises | 19588 |

| | |
|---------------------|---|
| RNase A (17,500 U) | 2,5 ml (100 mg/ml ; 7 000 unités/ml, solution) |
| Buffer ATL (200 ml) | Tampon de lyse de tissu de 200 ml pour 1 000 préparations |

19101

19076

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Ce kit est destiné au diagnostic in vitro. Les produits *ipsogen* ne peuvent être revendus, modifiés pour la revente ou utilisés pour fabriquer d'autres produits commerciaux sans l'autorisation écrite de QIAGEN.

Les informations contenues dans ce document peuvent être modifiées sans préavis. QIAGEN décline toute responsabilité pour toute éventuelle erreur apparaissant dans ce document. Ce document est considéré comme complet et exact au moment de sa publication. QIAGEN ne pourra en aucun cas être tenu responsable de dommages accessoires, particuliers, multiples ou consécutifs en relation avec, ou découlant de, l'utilisation de ce document.

Les spécifications présentées par les produits *ipsogen* sont garanties. La seule obligation de QIAGEN ainsi que le seul recours de tout client sont limités au remplacement sans frais des produits dans le cas où ces derniers ne correspondent pas aux performances garanties.

La mutation JAK2 V617F et ses applications sont protégées par des brevets dont le brevet européen EP1692281, les brevets US 7,429,456 et 7,781,199, les demandes de brevet US20090162849 et US20120066776 et leurs équivalents étrangers.

L'achat de ce produit ne confère aucun droit pour son utilisation dans le cadre d'essais cliniques pour des thérapies ciblant ou utilisant JAK2V617F. QIAGEN développe des programmes de licences spécifiques pour ce type d'utilisation. Veuillez contacter notre département Licences et Propriété Intellectuelle à l'adresse suivante : jak2licenses@qiagen.com.

Marques déposées : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony®, HotStarTaq®, *ipsogen*®, MutaQuan®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co).

Accord de licence limitée

Us En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR accepte les conditions suivantes :

1. Le kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR doit être utilisé conformément au *Manuel du kit ipsogen JAK2 RGQ PCR* et uniquement avec les composants fournis à l'intérieur de ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans le *Manuel du kit ipsogen JAK2 RGQ PCR* et autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(s) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont octroyés sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN est susceptible de faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais d'investigation et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application du présent Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir le site www.qiagen.com.
HB-1829-005 1107956 157038730 © 2017 QIAGEN, all rights reserved.

Pour commander www.qiagen.com/shop | Support technique support.qiagen.com | Site Web www.qiagen.com

