

April 2017

ipsogen[®] CALR RGQ PCR Kit-handleiding



24

Versie 1

IVD

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

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

REF

674023



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

R2 **MAT**

1103549NL



Inhoud

Beoogd gebruik.....	4
Samenvatting en uitleg	4
Uitgangspunt van de procedure.....	9
Meegeleverde materialen	14
Inhoud van de kit.....	14
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	15
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	17
Vorzorgsmaatregelen	18
Opslag en verwerking reagentia	20
Opslag en verwerking van monsters	21
Volbloed	21
Monsters van genomisch DNA	21
Procedure	22
Extractie en bereiding van genomisch DNA.....	22
Handmatige gDNA-extractie met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.....	22
Geautomatiseerde gDNA-extractie met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit....	26
Kwantificatie en bepaling van de zuiverheid van DNA	31
Normalisatie van monsters van genomisch DNA	31
Protocol: qPCR met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.....	32
De Gamma-invoegtoepassing installeren en het assayprofiel importeren	32
Een laadblok en rotor instellen	35
Een werklijst maken	38

De qPCR instellen	39
De Rotor-Gene MDx voorbereiden en de qPCR-run starten.....	41
qPCR-resultaten vrijgeven en rapporteren	42
Interpretatie van de resultaten	44
Gegevensanalyse	44
Nieuwe proeven	46
Weergave van resultaten	48
Problemen oplossen.....	57
Kwaliteitscontrole.....	67
Beperkingen.....	67
Kwaliteitskenmerken.....	69
Blancolimiet	69
Detectielimiet	69
DNA-input	70
Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid	70
Stoffen met een versturende werking.....	72
Specificiteit.....	72
Klinische validatie en vergelijking van methoden.....	73
Referenties	76
Symbolen	77
Bestelgegevens.....	79

Beoogd gebruik

De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit is een real-time in-vitrotest voor PCR die is bestemd voor de detectie van *CALR*-mutaties in genomisch DNA uit volbloed van proefpersonen met verdenking van myeloproliferatieve neoplasmata (MPN). De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit maakt daarnaast de identificatie van de twee grote *CALR*-mutaties (type 1 en type 2) mogelijk, en is bestemd voor gebruik in combinatie met het QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM Platform. Het product is bedoeld voor gebruik door professionele gebruikers, zoals technici en artsen die zijn opgeleid in moleculaire biologische technieken.

Bij de omgang met de producten dient alle gepaste zorgvuldigheid en oplettendheid in acht te worden genomen.

We raden alle gebruikers van QIAGEN-producten aan zich te houden aan de richtlijnen van de National Institutes of Health (NIH) die zijn opgesteld voor recombinant-DNA-proeven of aan andere toepasselijke richtlijnen.

Samenvatting en uitleg

Myeloproliferatieve neoplasmata zijn een verzameling ziekten die 39% van hematologische maligniteiten uitmaken. Ze worden gekenmerkt door chronische accumulatie van verschillende volwassen bloedceltypen in het bloed, die ofwel Philadelphiachromosoom-positief (Ph+) dan wel Philadelphiachromosoom-negatief (Ph-) zijn.

Een terugkerende somatische mutatie, V617F, die invloed heeft op het Janus-tyrosinekinase 2-gen (*JAK2*), werd ontdekt in 2005 (1–4). Dit betekende een grote doorbraak om MPN te begrijpen, classificeren en diagnosticeren. Onder patiënten met MPN Ph- is de *JAK2* V617F-mutatie gedetecteerd bij > 95% van de patiënten met polycythaemia vera (PV), bij 50–60% van de patiënten met essentiële trombocytemie (ET) en bij 50% van de patiënten met primaire myelofibrose (PMF). Bovendien heeft 5–10% van de patiënten met ET en PMF

activerende mutaties in het trombopoëtinereceptorgen (*MPL*). Bij de resterende 30–45% van de patiënten is geen specifieke moleculaire merker geïdentificeerd.

De ontdekking van somatisch verworven mutaties in het *CALR*-gen (waardoor de proteïne calreticuline wordt gecodeerd) in een substantieel deel van de patiënten met MPN Ph- heeft een nieuwe merker opgeleverd voor klonale ziekte (5, 6), waardoor zowel de diagnose als prognose wordt verbeterd bij deze gevallen die voorheen niet moleculair waren gekarakteriseerd. Somatische inserties of deleties in exon 9 van *CALR* zijn gevonden bij het merendeel van de patiënten met MPN Ph- zonder *JAK2*-mutatie. In totaal zijn voor *CALR* aanvankelijk 36 typen geïdentificeerd (Tabel 1), bestaande uit inserties, deleties, substituties of een combinatie daarvan. De meeste veroorzaakten een frameshift met hetzelfde alternatieve reading frame, wat leidde tot de generatie van mutante *CALR*-proteïnen die dezelfde nieuwe aminozuursequentie delen bij de C-terminus. Er werd gesuggereerd dat deze frameshift de cellulair lokaliseringsfunctie van de verschillende gemuteerde proteïnen aanpast en invloed heeft op de Ca²⁺-bindingsfunctie van hun C-terminusdomeinen.

Het exacte pathologische mechanisme is nog niet volledig verklaard, maar in-vitro-onderzoek laat zien dat overexpressie van de meest frequente *CALR*-deletie (type 1-mutatie, zie tabel 1) cytokineonafhankelijke celgroei (5) veroorzaakt.

Tabel 1. Lijst met *CALR*-mutaties van type 1 tot type 36

Type	COSMIC ID*	Frequentie (%) [†]	cDNA-notatie van mutant <i>CALR</i>
1	COSM1738055	53	c.1092_1143del
2	COSM1738056	31,7	c.1154_1155insTTGTC
3	COSM1738150	1,7	c.1095_1140del
4	COSM1738151	1	c.1102_1135del
5	COSM1738057	0,7	c.1091_1142del
6	COSM1738152	0,7	c.1094_1139del
7	COSM1738343	0,7	c.1102_1153del

Type	COSMIC ID*	Frequentie (%)†	cDNA-notatie van mutant CALR
8	COSM1738153	0,7	c.1104_1137del
9	COSM1738154	0,7	c.1140del
10	COSM1738155	0,7	c.1154delinsTGTGTC
11	NI [‡] ; COSM1738150	0,3	[c.1092G>C;1095_1140del]
12	COSM1738359	0,3	c.1098_1131del
13	COSM1738339	0,3	c.1100_1134delinsA
14	COSM1738368	0,3	c.1101_1134del
15	COSM1738151; NI [‡]	0,3	[c.1102_1135del;1145C>G]
16	COSM1738157	0,3	c.1102_1137delinsCA
17	COSM1738153; NI [‡]	0,3	[c.1104_1137del;1148A>T]
18	COSM1738158	0,3	c.1104_1155del
19	COSM1738349	0,3	c.1110_1140del
20	COSM1738159	0,3	c.1118_1136del
21	COSM1738160	0,3	c.1118_1145delinsCGTTA
22	COSM1738328	0,3	c.1120_1123del
23	COSM1738344	0,3	c.1120_1131delinsTGCGT
24	COSM1738345	0,3	c.1120_1138del
25	COSM1738346	0,3	c.1122_1141delinsA
26	COSM1738350	0,3	c.1122del
27	COSM1738351	0,3	c.1123_1125delinsTGTTT
28	COSM1738329	0,3	c.1131_1152del
29	COSM1738352	0,3	c.1135_1152delins CCTCCTCTTGCT
30	COSM1738353	0,3	c.1137_1154delins CCATCCTGTC
31	NI [‡] ; COSM1738056	0,3	[c.1151A>G;1154_1155insTTGTC]
32	COSM1738330	0,3	c.1153_1154delinsTGTC

Type	COSMIC ID*	Frequentie (%)†	cDNA-notatie van mutant CALR
33	COSM1738355	0,3	c.1154_1155insATGTC
34	COSM1738331	0,3	c.1154_delinsCTTGTC
35	COSM1738356	0,3	c.1154delinsTTTGTC
36	COSM1738332	0,3	c.1155_1156insTGTCG

* ID's van COSMIC v72 (cancer.sanger.ac.uk/cosmic/).

† Frequenties van Klampfl et al. (2013) (5).

‡ NI: Mutatiegebeurtenis niet geïdentificeerd in COSMIC.

Traditioneel werd de diagnose van MPN's gebaseerd op klinische beenmerghistologie en cytogenetische criteria. De ontdekking van een ziektespecifieke moleculaire merker heeft geleid tot een vereenvoudiging van het proces en toegenomen diagnostische nauwkeurigheid. Een belangrijk doel in het veld van MPN was om te begrijpen wat de moleculaire basis is voor ET en PMF in patiënten zonder *JAK2*- en *MPL*-mutaties. Zo biedt de ontdekking van *CALR*-mutaties een extra moleculaire merker voor de diagnose en prognose van patiënten met MPN Ph-. Detectie van de *CALR*-mutatie maakt nu deel uit van de referentiecriteriën die de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) in 2016 heeft gesteld voor de diagnose van MPN (tabel 2). De aanwezigheid van deze mutatie is een belangrijk criterium voor diagnostische bevestiging.

Tabel 2. WHO-criteria voor de diagnose van MPN (aangepast van referentie 7)

WHO-criteria voor een diagnose van essentiële trombocytemie

Belangrijke criteria:

1. Aantal bloedplaatjes $\geq 450 \times 10^9/l$.
2. Beenmergbiopsie laat proliferatie zien van met name de megakaryocytenlijn met een verhoogd aantal vergrote, volwassen megakaryocyten met hypergelobuleerde kernen. Geen significante toename of linksverschuiving van neutrofiële granulopoëse of erytropoëse en zeer zelden een kleine toename van reticulaire vezels.
3. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor *BCR-ABL1*+ CML*, PV, PMF, myelodysplastische syndromen (MDS) of andere myeloproliferatieve neoplasmata.
4. Aanwezigheid van *JAK2*-, *CALR*- of *MPL*-mutatie.

Minder belangrijk criterium:

Aanwezigheid van een klonale merker of afwezigheid van bewijs voor reactieve trombocytose.

WHO-criteria voor een diagnose van primaire myelofibrose

Belangrijke criteria:

1. Aanwezigheid van proliferatie van megakaryocyten en atypie in combinatie met ofwel reticuline- en/of collageenfibrose.
2. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor ET, PV, *BCR-ABL1*+ CML, MDS of andere myeloproliferatieve neoplasmata.
3. Aanwezigheid van *JAK2*-, *CALR*- of *MPL*-mutatie of, indien deze mutaties afwezig zijn, de aanwezigheid van een andere klonale merker of de afwezigheid van reactieve myelofibrose.

Minder belangrijke criteria:

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

- a) Anemie die niet kan worden toegeschreven aan een comorbide aandoening
- b) Leukocytose $\geq 11 \times 10^9/l$
- c) Palpabele splenomegalie
- d) LDH* toegenomen tot boven de normale bovenlimiet van het referentieberek van de instelling
- e) Leuko-erytroblastose

WHO-criteria voor polycythaemia vera

Belangrijke criteria:

1. Hemoglobine (Hb) > 16,5 g/dl voor mannen, Hb > 16,0 g/dl voor vrouwen; of hematocriet (Ht) > 49% voor mannen, Ht > 48% voor vrouwen; of toegenomen rodebloedcellenmassa.
2. Beenmergbiopsie laat hypercellulariteit voor leeftijd zien met groei van drie cellijnen (panmyelose) inclusief prominente erytroïde proliferatie, proliferatie van granulocyten en proliferatie van megakaryocyten met pleomorfe, volwassen megakaryocyten (verschillend in formaat).
3. Aanwezigheid van *JAK2* V617F- of *JAK2* exon 12-mutatie

Minder belangrijk criterium:

Subnormaal erytropoëtiëgehalte in serum

* CML: chronische myeloïde leukemie; LDH: lactaatdehydrogenase.

De detectie van *CALR*-mutaties in gDNA geëxtraheerd uit perifere bloedcellen wordt nu op dezelfde manier als diagnostisch hulpmiddel gebruikt als de detectie van *JAK2*-mutaties, die de diagnose van patiënten met MPN hebben vereenvoudigd en de nauwkeurigheid daarvan hebben verbeterd. De *CALR*- en *JAK2*-testen (*ipsogen CALR* RGQ PCR Kit en *ipsogen JAK2* RGQ PCR Kit) zijn gevalideerd met dezelfde gDNA-extractiemethoden, zodat een monster kan worden getest met twee verschillende qPCR-kits.

Uitgangspunt van de procedure

De *ipsogen CALR* RGQ PCR Kit is een real-time PCR-test. De kit gebruikt kwantitatieve, real-time PCR- (qPCR-)technieken voor de kwalitatieve detectie van somatische mutaties in de regio c.1091_1162 (cDNA-notatie) van exon 9 in het gen *CALR* (GenBank®-volgnummer CR457070) (5, 6). De kit maakt het bovendien mogelijk de twee grote *CALR*-mutaties (type 1 en type 2) te detecteren.

De kit biedt reagentia voor het uitvoeren van zeven afzonderlijke PCR-amplificatiereacties in dezelfde run voor de identificatie van *CALR*-mutaties van type 1 en type 2 en de detectie van aanvullende kleine varianten (vermeld bij “Kwaliteitskenmerken/Specificiteit” op pagina 72) in genomisch DNA geëxtraheerd uit humaan perifeer volbloed. De doorlooptijd van alle taken, van gDNA-extractie (met de hand of automatisch) tot gegevensanalyse, is minder dan één werkdag.

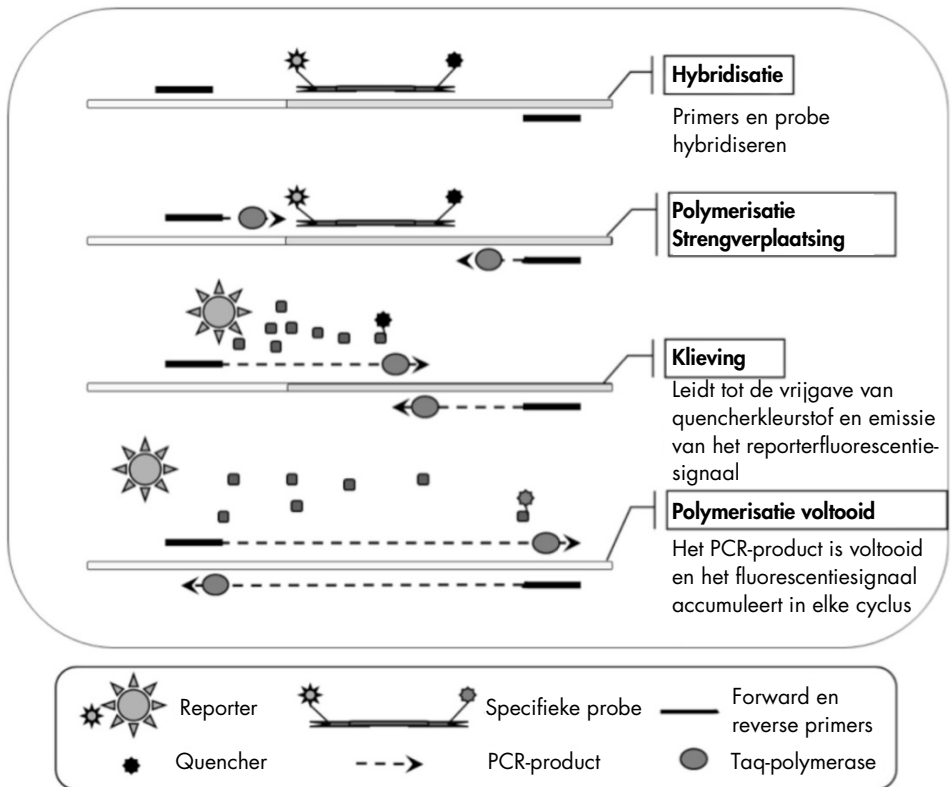
Met real-time PCR is accurate detectie van een doel-DNA-sequentie mogelijk tijdens de exponentiële fase van het amplificatieproces. Real-time PCR-gegevens kunnen snel worden verkregen, zonder verwerking na de PCR, dankzij real-time detectie van fluorescente signalen tijdens de PCR-cyclus. Momenteel zijn er drie hoofdtypen qPCR-technieken beschikbaar: qPCR-analyse met SYBR® Green I-kleurstof, qPCR-analyse met hydrolyseprobes en qPCR-analyse met hybridisatieprobes.

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

Als het onderzochte doel aanwezig is, zullen gedurende de PCR de forward en reverse primers specifiek hybridiseren aan de gehybridiseerde probe en deze flankeren. Het 3'-uiteinde van de probe wordt geblokkeerd om extensie van de probe tijdens de PCR te voorkomen (afbeelding 1). Tijdens de polymerisatiefase wordt de probe gekleefd door 5'→3' exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase, wat leidt tot de vrijgave van de quencherkleurvloeistof en emissie van het reporterfluorescentiesignaal. De probefragmenten worden vervolgens van het doel af verplaatst en polymerisatie van de streng gaat verder. Dit

proces vindt plaats in elke cyclus en veroorzaakt de exponentiële accumulatie van het product niet (zie afbeelding 1).

De toename van het fluorescente signaal wordt alleen gedetecteerd als de doelsequentie complementair is met de primers en probe en zodoende wordt geamplificeerd gedurende de PCR.

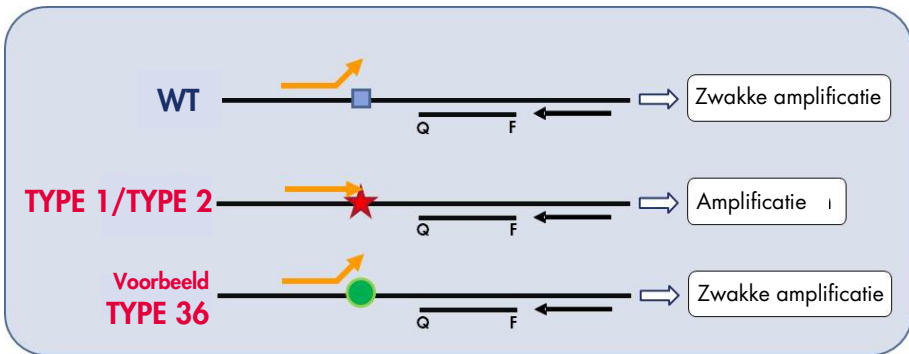


Afbeelding 1. Principe van real-time PCR-reacties.

Identificatie van de twee grote CALR-mutaties

Voor de identificatie van CALR-mutaties van type 1 en type 2 wordt een allel-specifieke amplificatie uitgevoerd met ARMS-technologie (Amplification Refractory Mutation System) die gebruikmaakt van de specifieke hybridisatie van primers tot een complementaire sequentie en het vermogen van de DNA-polymerase om onderscheid te maken tussen overeenstemming en geen overeenstemming bij het 3'-uiteinde van een PCR-primer.

Wanneer de PCR-primer volledig overeenkomt, verloopt de amplificatie volledig efficiënt. Wanneer de 3'-base niet overeenkomt, vindt alleen zwakke achtergrondamplificatie plaats (afbeelding 2).



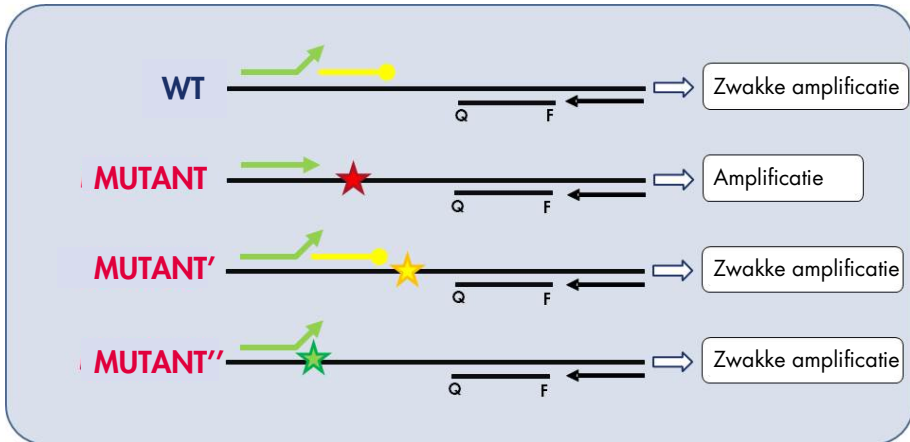
Afbeelding 2. Identificatie van CALR-mutaties van type 1 en type 2 met ARMS PCR.

WT: wildtype; Q – F: BHQ[®] – FAM[™] double-dye probe; ↗ ↖ forward primer (oranje) en reverse primer (zwart).

Detectie van kleine varianten van CALR-mutaties

Voor de detectie van kleine varianten van CALR-mutaties worden primers en probes in de reactiemengsels gecombineerd met een extra oligonucleotide dat 3'-geblokkeerd is met de toevoeging van een fosfaatgroep (een zogenaamde CLAMP-oligonucleotide). De CLAMP-oligonucleotide is specifiek voor op wildtype gerichte sequenties en verhindert, indien gehybridiseerd, elongatie van het PCR-product (PCR-clamping). Als de PCR-template de

wildtypesequentie bevat, hybridiseert de CLAMP vóór de PCR-primer en is er geen of slechts een lage extensie door de DNA-polymerase. Als er een gemuteerde doelsequentie aanwezig is, hybridiseert de CLAMP niet of slechts matig, bindt de PCR-primer en gaat de amplificatie verder (afbeelding 3).



Afbeelding 3. Detectie van kleine CALR-mutaties. WT: wildtype; Q – F: BHQ – FAM double-dye probe; ↗ forward primer (oranje) en reverse primer (zwart); —○: 3'-fosfaatoligonucleotide (CLAMP-oligonucleotide; geel).

Interne amplificatiecontrole (IAC) in alle reactiemengsels

Om de qPCR-reactie in de aanwezigheid van een humane genomische DNA-template (gDNA-template) te valideren en beheersen, bevat elk CALR-reactiemengsel primers en een probe om een endogene sequentie van het humane gen *ABL1* te detecteren. Deze controle-sequentie wordt geamplificeerd in een multiplex-PCR-reactie van al het CALR-mutant- en -wildtype-DNA en wordt gemerkt met hexachlorofluoresceïne (HEX™) om het te onderscheiden van de met fluoresceïneamidiet (FAM) gemerkte amplicons in de mutatiereacties. Voor beide probes is de quencher Black Hole Quencher® (BHQ-1).

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

<i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit		(24)
Catalogusnummer		674023
Aantal reacties		24
Kleur	Identificatie	Inhoud
Geel	CALR Reaction Mix Type 1 (CALR-reactiemengsel type 1)	850 µl
Geel	CALR Reaction Mix Type 2 (CALR-reactiemengsel type 2)	850 µl
Paars	CALR Reaction Mix CLAMP 1 (CALR-reactiemengsel CLAMP 1)	850 µl
Paars	CALR Reaction Mix CLAMP 2 (CALR-reactiemengsel CLAMP 2)	850 µl
Paars	CALR Reaction Mix CLAMP 3 (CALR-reactiemengsel CLAMP 3)	850 µl
Paars	CALR Reaction Mix CLAMP 4 (CALR-reactiemengsel CLAMP 4)	850 µl
Paars	CALR Reaction Mix CLAMP 5 (CALR-reactiemengsel CLAMP 5)	850 µl
Groen	CALR Wild-Type Control (CALR-wildtypecontrole)	145 µl
Rood	CALR Mutant Control (CALR-mutantcontrole)	145 µl
Mint	Taq DNA Polymerase (Taq DNA-polymerase)	85 µl
Wit	TE Buffer (TE-buffer)	1,9 ml

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Voor meer informatie raadpleegt u de bijbehorende veiligheidsinformatiebladen (VIB's), verkrijgbaar bij de productleverancier.

Zorg ervoor dat instrumenten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

- Speciale pipetten (verstelbaar) (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)

Er wordt een minimum van twee pipetsets aanbevolen: een voor de bereiding en distributie van PCR-reactiemengsels en een voor DNA-verwerking, waaronder het laden van de PCR-template.

- Nucleasevrije, aerosol-resistente, steriele PCR-pipettips met hydrofobe filters
- Nucleasevrije PCR-buisjes van 1,5 ml of 2,0 ml
- Wegwerphandschoenen
- Vortexmixer
- Spectrofotometer

Aanvullende instrumenten en materialen voor handmatige DNA-extractie

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104)
- Ethanol (96–100%)

Opmerking: Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien deze andere substanties bevat, zoals methanol of methylethylketon.

- Verwarmingsblok voor het lyseren van monsters op 56 °C
- Benchtop-centrifuge* met rotor voor reageerbuisjes van 0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml (die snelheden van 13.000–14.000 tpm kan halen)

Aanvullende instrumenten en materialen voor automatische DNA-extractie

- QIASymphony® SP-instrument (catalogusnr. 9001297), softwareversie 4.0 of hoger en bijbehorende accessoires, waaronder het Blood_200_V7_DSP-protocol
- Tube Insert 3b (geleidebuisje 3b, catalogusnr. 9242083)
- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (monsterbereidingscartridges, 8 putjes, catalogusnr. 997002)
- 8-Rod Covers (afdekkingen voor 8 staafjes, catalogusnr. 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (filtertips, 1500 µl, catalogusnr. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (filtertips, 200 µl, catalogusnr. 990332)
- Elution Microtubes CL (elutiemicrobuisjes CL, catalogusnr. 19588)
- Tip disposal bags (afvalzakken voor tips, catalogusnr. 9013395)
- Microtubes 2.0 ml Type H (microbuisjes 2,0 ml type H, Sarstedt®, catalogusnr. 72.694)

Aanvullende instrumenten en materialen voor PCR met Rotor-Gene Q MDx

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (catalogusnr. 9002032) en bijbehorende accessoires
- Versie 2.1.x (waarbij x = 0 of hoger) van de Rotor-Gene AssayManager®-software
- Versie 1.0.x (waarbij x = 0 of hoger) van de Gamma-invoegtoepassing voor Rotor-Gene AssayManager v2.1
- Versie 1.0.x (waarbij x = 2 of hoger) van het CALR-assayprofiel ipsogen_CALR_blood_CE
- Loading Block for 72 × 0.1 ml Tubes (Laadblok voor 72 buisjes van 0,1 ml, catalogusnr. 9018901)
- 72-Well Rotor (rotor met 72 putjes, catalogusnr. 9018903)
- Adaptor Locking Ring 72-Well Rotor (vergrendelingsring voor rotor met 72 putjes, catalogusnr. 9018904)
- Rotor Holder (rotorhouder, catalogusnr. 9018908)

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for the Rotor-Gene Q MDx (stripbuisjes met dopjes, 0,1 ml, voor de Rotor-Gene Q MDx, catalogusnr. 981103 of 981106)
- IJs (of een koelblok)

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg de bijbehorende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) voor meer informatie. Deze zijn als PDF beschikbaar op www.qiagen.com/safety. Hier kunt u ook de VIB voor elke QIAGEN-kit en elk onderdeel van de kit vinden, bekijken en afdrukken.

Raadpleeg de desbetreffende handleidingen voor veiligheidsinformatie met betrekking tot de extractiekits QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104) en QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236). Raadpleeg de desbetreffende gebruikershandleidingen voor veiligheidsinformatie met betrekking tot de instrumenten.

WAARSCHUWING Risico op lichamelijk letsel



Voeg geen bleekmiddel of zuuroplossingen toe aan het afval van monsterbereiding.

Buffers in de reagenscartridge van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit bevatten guanidinezouten die zeer reactieve verbindingen kunnen vormen als ze worden gecombineerd met bleekmiddel. Als vloeistof dat deze buffers bevat, wordt gemorst, reinigt u met een geschikt laboratoriumreinigingsmiddel en water. Als de gemorste vloeistof potentieel besmettelijke agentia bevat, reinigt u het betreffende oppervlak eerst met een laboratoriumreinigingsmiddel en water, en vervolgens met 1% (v/v) natriumhypochloriet.

Voorzorgsmaatregelen

Voor het gebruik van qPCR-testen zijn goede laboratoriumtechnieken vereist, waaronder traceerbaarheid, onderhoud van de apparatuur voor moleculaire biologie en naleving van de geldende regelgeving en relevante normen.

Deze kit is bestemd voor in vitro diagnostisch gebruik. De reagentia en instructies in deze kit zijn getest voor optimale prestaties.

- Alle chemische en biologische materialen zijn potentieel gevaarlijk. Monsters zijn potentieel besmettelijk en dienen als biologisch gevaarlijk materiaal te worden behandeld.
- Gooi afval van monsters en assays weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.
- De reagentia voor de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit zijn optimaal verdund. Verdun reagentia niet nog meer, want dit kan leiden tot slechtere prestaties.
- Gebruik geen reactievolumes (reactiemengsel plus monster) van onder de 25 µl.
- De procedures voor kwaliteitscontrole van QIAGEN omvatten functionele testen van kits voor iedere afzonderlijke kitpartij. Meng daarom geen reagentia van verschillende partijen, aangezien dit invloed kan hebben op de prestaties.
- Zorg ervoor dat de assayprofielbestanden en de vereiste Rotor-Gene AssayManager v2.1-invoegtoepassing zijn geïnstalleerd.
- Raadpleeg de *Rotor-Gene Q MDx User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene Q MDx) en de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1) voor aanvullende waarschuwingen, voorzorgsmaatregelen en procedures.
- Het hanteren van andere incubatietijden of temperaturen kan leiden tot foutieve of strijdige gegevens.
- Bereid alle reacties (reactiemengsel plus monster) op ijs of in een koelblok.
- Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken of die onjuist zijn opgeslagen.

-
- Reactiemengsels kunnen veranderen als ze worden blootgesteld aan licht.
 - Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie van de mengsels met de materialen in de CALR-mutantcontrole- en CALR-wildtypecontrolereagentia.
 - Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven DNA of PCR-product, die kan leiden tot een fout-positief signaal.
 - Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie door DNase, die kan leiden tot degradatie van de template-DNA.
 - Gebruik afzonderlijke, speciale pipetten om reactiemengsels te maken en templates toe te voegen.
 - Open het Rotor-Gene Q MDx-instrument niet totdat de run is voltooid.
 - Open Rotor-Gene Q MDx-buisjes niet nadat de run is voltooid. Gooi buisjes weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.
 - Wees extra voorzichtig om te zorgen voor het correct testen van monsters en let op verkeerde invoer van monsters, fouten bij het laden en fouten met de pipetten.
 - Zorg ervoor dat er op een systematische manier wordt omgegaan met de monsters om te zorgen voor correcte identificatie.

We raden het volgende aan:

- Gebruik nucleasevrije laboratoriumbenodigdheden (zoals pipetten, pipettips, reactieflacons) en draag handschoenen wanneer u de assay uitvoert.
- Gebruik bij alle stappen van het pipetteren ongebruikte aerosol-resistente pipettips ter voorkoming van kruiscontaminatie van de monsters en reagentia.
- Bereid een mastermengsel vóór PCR met speciaal daarvoor bestemde materialen (pipetten, tips, etc.) in een speciaal daarvoor bestemde ruimte waar geen DNA-matrijzen (DNA, plasmiden of PCR-producten) kunnen worden geïntroduceerd. Voeg in dezelfde ruimte TE-buffer toe aan de NTC-buisjes en sluit deze. De monsters die u wilt testen en de CALR-mutantcontrole- en CALR-wildtypecontrolereagentia voegt u in een andere ruimte toe met specifiek materiaal (pipetten, tips enzovoort).

Opslag en verwerking reagentia

De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit wordt verzonden op droogijs. Als een component van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit bij aankomst niet bevroren is, als de buitenverpakking tijdens het vervoer open is geraakt of als de verzending geen pakbon of reagentia bevat, neemt u contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN of met de lokale distributeur (ga naar www.qiagen.com).

De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit moet direct na ontvangst worden opgeslagen bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C. Gebruik daarvoor een vriezer met een constante temperatuur die is beschermd tegen licht. Als de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit wordt bewaard in de gespecificeerde bewaarcondities, is de kit stabiel tot de vermelde vervaldatum.

Eenmaal geopend kunnen reagentia in de originele verpakking worden bewaard bij een temperatuur van -30 tot -15 °C tot de vervaldatum die staat vermeld op de verpakking. Vermijd herhaald ontdooien en invriezen. Houd een maximum van 5 cycli van invriezen en ontdooien aan.

Raadpleeg de desbetreffende handleidingen voor informatie over opslag en verwerking met betrekking tot de extractiekits QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104) en QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236).

Let goed op de vervaldatum en bewaarcondities die staan vermeld op het etiket van de doos en op de etiketten van de componenten. Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken of die onjuist zijn opgeslagen.

Opslag en verwerking van monsters

Volbloed

De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit is bestemd voor gebruik met monsters van genomisch DNA geëxtraheerd uit volbloedmonsters ontsteld met 2K-EDTA. Volbloed kan als volgt worden bewaard:

- bij 2 °C tot 8 °C gedurende maximaal 96 uur,
- bij 15°C tot 25°C gedurende maximaal 96 uur,
- bevroren bij -30°C tot -15°C gedurende maximaal 1 maand.

Monsters van genomisch DNA

Genomisch DNA mag worden opgeslagen bij een temperatuur van 2 °C tot 8 °C gedurende 1 week na extractie of bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C gedurende maximaal 24 maanden, ofwel direct na de extractie, dan wel na verdunning met TE-buffer.

Procedure

Extractie en bereiding van genomisch DNA

De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit is gevalideerd in combinatie met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104) voor handmatige extractie of het QIASymphony SP-instrument in combinatie met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236) voor automatische extractie.

Zorg ervoor dat de vervaldatum van de reagentia voor gDNA-extractie niet is verstreken en dat deze zijn vervoerd en bewaard onder de juiste condities.

Handmatige gDNA-extractie met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Handmatige gDNA-extractie dient te worden uitgevoerd met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104) conform het *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook* (Handleiding voor de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit).

Wat u moet doen voor u begint

- Laat de bloedmonsters op kamertemperatuur komen (15–25 °C) en controleer of ze goed zijn gehomogeniseerd.
- De lysisbuffer bereiden
Als er zich bezinsel heeft gevormd in de lysisbuffer (AL), lost u deze op door te incuberen op 56 °C.
- QIAGEN-protease bereiden
Voeg 1,2 ml proteaseoplosmiddel (PS) toe aan de flacon met gelyofiliseerde QIAGEN-protease (QP) en meng voorzichtig. Meng door de flacon meerdere keren om te keren. Zo voorkomt u dat het mengsel gaat schuimen. Zorg ervoor dat de QP volledig wordt opgelost.

Opmerking: Eenmaal opgelost in PS, is QP gedurende 2 maanden stabiel indien bewaard bij een temperatuur van 2–8 °C. Voor een langere levensduur van de protease wordt opslag bij een temperatuur van -20 °C aanbevolen, maar herhaald invriezen en ontdooien dient te worden vermeden. Daarom wordt aanbevolen aliquots van QP op te slaan.

- Spoelbuffer 1 bereiden

Gebruik een maatcilinder om 25 ml ethanol (96–100%) toe te voegen aan de fles met 19 ml spoelbuffer 1-concentraat (AW1). Bewaar de gereconstitueerde AW1 op kamertemperatuur (15–25 °C).

Opmerking: Meng de gereconstitueerde AW1 altijd door de fles meerdere keren om te keren voordat u de procedure start.

- Spoelbuffer 2 bereiden

Gebruik een maatcilinder om 30 ml ethanol (96–100%) toe te voegen aan de fles met 13 ml spoelbuffer 2-concentraat (AW2). Bewaar de gereconstitueerde AW2 op kamertemperatuur (15–25 °C).

Opmerking: Meng de gereconstitueerde AW2 altijd door de fles meerdere keren om te keren voordat u de procedure start.

- De elutiebuffer bereiden

De kit bevat één fles elutiebuffer (AE). Ter voorkoming van contaminatie van de AE raden we ten eerste aan om pipettips met aerosolbarrières te gebruiken wanneer u de AE uit de fles pipetteert en om de dop van de fles direct erna weer terug te plaatsen.

Laat de AE op kamertemperatuur komen (15–25 °C).

- Stel een verwarmingsblok in op 56 °C om te gebruiken in stap 4.

Procedure

1. Pipetteer 20 µl QP in een lysisbuisje (LT).

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

2. Voeg 200 µl bloedmonster toe aan het lysisbuisje.

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

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

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

Belangrijk: Voeg QP niet rechtstreeks toe aan de AL.

4. Incubeer bij 56 °C (± 1 °C) gedurende 10 minuten (± 1 minuut).
5. Centrifugeer het lysisbuisje gedurende ongeveer 5 seconden op volle snelheid om druppels van de binnenkant van het deksel te verwijderen.
6. Voeg 200 µl ethanol (96–100%) toe aan het lysisbuisje, sluit het deksel en meng grondig gedurende ≥ 15 seconden met een pulse-vortexmixer.
7. Centrifugeer het lysisbuisje gedurende ≥ 5 seconden op volle snelheid om eventuele druppels vloeistof van de binnenkant van het deksel te verwijderen.
8. Breng het volledige lysaat van stap 7 over naar de QIAamp Mini-draaikolom zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-draaikolom niet aan met de pipettip.

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

9. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-draaikolom en centrifugeer op ongeveer 6000 $\times g$ (8000 tpm) gedurende 1 minuut.
10. Plaats de QIAamp Mini-draaikolom in een schoon speelbuisje (WT) en gooi het buisje met het filtraat weg.

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

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

11. Open voorzichtig de QIAamp Mini-draaikolom en voeg 500 µl AW1 toe zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-draaikolom niet aan met de pipettip.
12. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-draaikolom en centrifugeer op ongeveer 6000 × g (8000 tpm) gedurende 1 minuut.
13. Plaats de QIAamp Mini-draaikolom in een schoon spelbuisje en gooi het busje met het filtraat weg.
14. Open voorzichtig de QIAamp Mini-draaikolom en voeg 500 µl AW2 toe zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-draaikolom niet aan met de pipettip.
15. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-draaikolom en centrifugeer op volledige snelheid (ongeveer 20.000 × g, oftewel 14.000 tpm) gedurende 1 minuut.
16. Plaats de QIAamp Mini-draaikolom in een schoon spelbuisje en gooi het busje met het filtraat weg.
17. Centrifugeer op volledige snelheid (ongeveer 20.000 × g, oftewel 14.000 tpm) gedurende 3 minuten om het membraan volledig te drogen.
18. Plaats de QIAamp Mini-draaikolom in een schoon elutiebusje (ET) en gooi het spelbuisje met het filtraat weg.
19. Open voorzichtig het deksel van de QIAamp Mini-draaikolom en breng 50 tot 200 µl AE over naar het midden van het membraan.
Opmerking: Met lagere elutievolumes stijgt de uiteindelijke DNA-concentratie in het eluaat aanzienlijk, maar daalt de algehele DNA-opbrengst iets.
20. Sluit het deksel en incubeer gedurende 1 minuut bij kamertemperatuur (15–25 °C).
21. Centrifugeer op ongeveer 6000 × g (8000 tpm) gedurende 1 minuut om het DNA uit te wassen.
22. Bewaar het gDNA-monster onder de juiste condities.
23. Gooi gebruikte monsterbuisjes, schaalpjes en afval weg conform uw lokale veiligheidsvoorschriften.

Geautomatiseerde gDNA-extractie met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Geautomatiseerde gDNA-extractie dient te worden uitgevoerd met het QIASymphony SP-instrument in combinatie met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236). Volg de instructies in het *QIASymphony DSP DNA Kit Handbook* (Handleiding voor de QIASymphony DSP DNA Kit). Selecteer het **Blood_200_V7_DSP**-protocol op de QIASymphony.

Opmerking: De volgende eigenschappen van het protocol gelden specifiek voor extractie van gDNA uit volbloed voor analyse met de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit:

- Breng 300 µl volbloed over naar een microbuisje (2,0 ml type H, Sarstedt, catalogusnr. 72.694).
- Het elutievolume en de uitvoerpositie zijn **100** µl voor het volbloedprotocol.

Wat u moet weten voor u begint

- Het totale te extraheren volume volbloed is 200 µl (plus 100 µl dood volume).
- Zorg ervoor dat u bekend bent met de bediening van de QIASymphony SP. Raadpleeg de gebruikershandleidingen van uw QIASymphony SP-instrument voor bedieningsinstructies.
- Optioneel onderhoud is niet verplicht voor correcte werking van het instrument, maar wordt wel ten zeerste aanbevolen om de kans op contaminatie te reduceren.
- Voordat u de reagenscartridge voor de eerste keer gebruikt, dient u te controleren of de buffers QSL1 en QSB1 geen bezinsel bevatten.
Verwijder indien nodig de bakjes met de buffers QSL1 en QSB1 uit de reagenscartridge en incubeer gedurende 30 minutes op 37 °C, waarbij u af en toe schudt om het bezinsel op te lossen. Zorg ervoor dat u de bakjes in de juiste posities plaatst.
Als de reagenscartridge al is doorgestoken, moet u ervoor zorgen dat de bakjes zijn verzegeld met afsluitstrips voor hergebruik en moet u de volledige reagenscartridge gedurende 30 minuten incuberen op 37 °C in een waterbad dat u af en toe schudt.

- Vermijd dat u de reagenscartridge (RC) te hard schudt, want dan kan er schuim ontstaan, wat leidt tot detectieproblemen met de vloeistof.

Wat u moet doen voor u begint

- Voordat u de procedure start moet u ervoor zorgen dat de magnetische deeltjes volledig geresuspendeerd zijn.
Voorafgaand aan het gebruik dient u het bakje met de magnetische deeltjes gedurende minstens 3 minuten grondig te vortexen.
- Zorg ervoor dat het doorsteekdeksel op de reagenscartridge wordt geplaatst en dat het deksel van het bakje met magnetische deeltjes is verwijderd; of zorg ervoor, als u een gedeeltelijk gebruikte reagenscartridge gebruikt, dat de afsluitstrips voor hergebruik zijn verwijderd.
- Vergeet niet de enzymbuisjes te openen.
- Als de monsters van streepjescodes zijn voorzien, plaatst u de monsters zodanig in de buisjeshouder dat de streepjescodes naar de streepjescodelezer aan de linkerkant van de QIASymphony SP zijn gericht.

Procedure

1. Sluit alle lades en de kap.
2. Schakel de QIASymphony SP in en wacht tot het scherm **Sample Preparation** (Monsterbereiding) wordt weergegeven en de initialisatieprocedure is voltooid.
De aan/uit-schakelaar bevindt zich in de linkeronderhoek van de QIASymphony SP.
3. Meld u aan bij het instrument.
4. Selecteer het protocol dat u wilt uitvoeren.
Selecteer voor volbloedmonsters **Select All** (Alles selecteren), vervolgens **DNA Blood** (DNA-bloed) en dan **Blood_200_V7_DSP**.
5. Zorg ervoor dat de lade "Waste" (Afval) correct is voorbereid. Controleer of de componenten van de lade "Waste" (Afval) aanwezig zijn, waaronder de tipafvoer en container voor vloeibaar afval. Vervang indien nodig de afvalzak voor tips.

6. Plaats het benodigde elutierek in de lade "Eluate" (Eluaat).

Plaats geen plaat met 96 putjes in "Elution slot 4" (Elutiepositie 4).

Gebruik "Elution slot 1" (Elutiepositie 1) uitsluitend met de bijbehorende koelingsadapter.

Als u een plaat met 96 putjes gebruikt, moet u ervoor zorgen dat de plaat in de juiste richting wordt geplaatst, aangezien een onjuiste plaatsing ertoe kan leiden dat bij latere analyse de monsters door elkaar worden gehaald.

7. Plaats de vereiste reagenscartridge(s) en verbruiksartikelen in de lade "Reagents and Consumables" (Reagentia en verbruiksartikelen).

Opmerking: Zorg ervoor dat de pipettips correct zijn bevestigd in de lade.

8. Controleer of de componenten van de lade "Reagents and Consumables" (Reagentia en verbruiksartikelen) aanwezig zijn.

9. Breng 300 µl van het te extraheren volbloedmonster over naar een microbuisje (2,0 ml type H) en plaats dit in de 3B 2 ml-adapter op de monsterbuisjeshouder. Plaats de monsterbuisjes in de lade "Sample" (Monster).

10. Voer met het aanraakscherm de benodigde informatie in voor elke batch monsters die moet worden verwerkt:

- Monsterinformatie: pas het standaard buisjesformaat aan. Hiervoor selecteert u **Select All** (Alles selecteren) en vervolgens **Sarstedt reference 72.694** (Sarstedt-referentienr. 72.694) in het overzicht **Tube Insert** (Geleidebuisje).
- Bevestig het geselecteerde protocol: **Blood_200_V7_DSP**.
- Elutievolume en uitvoerpositie: Selecteer voor het volbloedprotocol **100 µl**.

Opmerking: Nadat u informatie over de partij hebt ingevoerd, verandert de status van **LOADED** (Geladen) in **QUEUED** (In de wachtrij). Zodra er een partij in de wachtrij staat, verschijnt de knop **Run** (Verwerken).

11. Start de run door op de knop **Run** (Verwerken) te drukken.

12. Lees en bevestig het bericht dat wordt weergegeven.

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

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

Opmerking: Het is mogelijk doorlopend monsters te plaatsen en toe te voegen aan deze run (totdat de reagentia worden geplaatst). Druk op de knop **Run** (Verwerken) om de zuiveringsprocedure te starten.

13. Aan het eind van de protocolrun verandert de status van de partij van **RUNNING** (Bezig met verwerken) in **COMPLETED** (Voltooid). Haal het elutierek met de gezuiverde nucleïne-zuren uit de lade “Eluate” (Eluaat).

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

14. Exporteer het QIASymphony SP-resultatenbestand: dit rapport wordt voor elke elutieplaat gegenereerd.

14a. Plaats de USB-stick in een van de USB-poorten aan de voorzijde van de QIASymphony SP.

14b. Klik op de knop **Tools** (Hulpmiddelen).

14c. Selecteer **File Transfer** (Bestandsoverdracht).

14d. Selecteer op het tabblad **In-/Output Files** (In-/uitvoerbestanden) **Results Files** (Resultatenbestanden) en klik op **Transfer** (Overdragen).

Zorg dat de naam van de bestandsexport de volgende indeling heeft:
jjjj-mm-dd hh:mm:ss_Elutierek-ID.

15. Controleer de kolom **Validity of result** (Geldigheid van resultaat) voor elk monster in het QIASymphony SP-resultatenbestand.

- Geldige en onduidelijke status: ga verder met DNA-kwalificering en -kwantificatie.
- Ongeldige status: monster wordt afgekeurd. Voer de extractiestap opnieuw uit.

16. Als een reagenscartridge slechts gedeeltelijk wordt gebruikt, sluit u deze af met de meegeleverde afsluitstrips voor hergebruik en sluit u buisjes met proteïnase K direct na de protocolrun af met schroefdoppen om verdamping te voorkomen.

17. Gooi gebruikte monsterbuisjes, schaalpjes en afval weg conform uw lokale veiligheidsvoorschriften.

18. Reinig de QIASymphony SP.

Volg de onderhoudsinstructies in de gebruikershandleidingen van uw QIASymphony SP-instrument. Reinig de tipbeveiligingen geregeld om het risico van kruiscontaminatie te minimaliseren.

19. Sluit de laden van het instrument en schakel de QIASymphony SP uit.

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

- Breng het buisje met het DNA over naar een geschikte magnetische separator (zoals QIAGEN 12-Tube Magnet, catalogusnr. 36912) totdat de magnetische deeltjes zijn gescheiden.
- Breng het buisje met het DNA over naar een geschikte magnetische separator (zoals QIAGEN 96-Well Magnet Type A, catalogusnr. 36915) totdat de magnetische deeltjes zijn gescheiden.
- Als u geen geschikte magnetische separator voorhanden hebt, centrifugeert u het buisje met het DNA gedurende 1 minuut op volledige snelheid in een microcentrifuge om eventuele resterende magnetische deeltjes te pelletiseren.

Kwantificatie en bepaling van de zuiverheid van DNA

Elutiebuffers die worden gebruikt in gDNA-extractiekits, bevatten het conserveringsmiddel natriumazide. Natriumazide absorbeert bij 260 nm. Daarom moet er een blanco meting worden uitgevoerd om de spectrofotometer te kalibreren. Afhankelijk van het extractie-protocol moet de elutiebuffer worden gebruikt voor de blanco meting.

- De verhouding A_{260}/A_{280} moet $\geq 1,7$ zijn. Kleinere verhoudingen duiden doorgaans op proteïnecontaminatie of de aanwezigheid van organische chemicaliën die van invloed zijn op de PCR-stap.
- De DNA-concentratie wordt bepaald door de absorptie bij 260 nm te meten. Absorptiemetingen bij 260 nm zijn alleen nauwkeurig als ze tussen 0,1 en 1,0 vallen. Een absorptie van 1 eenheid bij 260 nm komt overeen met 50 μg DNA per ml ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$).
Totale hoeveelheid gezuiverd DNA (ng) = DNA-concentratie x volume van het monster (μl).
- Als de verhouding A_{260}/A_{280} lager is dan 1,7 en/of als de gDNA-concentratie minder is dan 10 ng/ μl , mag het monster niet verder worden verwerkt.

Normalisatie van monsters van genomisch DNA

Verdun het DNA tot 10 ng/ μl in de TE-buffer uit de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit.

De PCR-reactie van de Rotor-Gene Q MDx is geoptimaliseerd voor 50 ng gezuiverd gDNA verdund in een eindvolume van 5 μl .

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

De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit moet worden gebruikt met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument in combinatie met automatische interpretatie van de resultaten met Rotor-Gene AssayManager v2.1. De cyclusparameters worden vergrendeld voor de run.

Neem de tijd om bekend te raken met het Rotor-Gene Q MDx-instrument en met versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software voordat u het protocol start. Raadpleeg de gebruikershandleidingen van het instrument, Rotor-Gene AssayManager v2.1 en de Gamma-invoegtoepassing voor meer informatie.

De Gamma-invoegtoepassing installeren en het assayprofiel importeren

Versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software moet zijn geïnstalleerd op de computer die is aangesloten op de Rotor-Gene Q MDx. De software kunt u downloaden bij **Operating Software** (Besturingssoftware) op het tabblad **Product Resources** (Hulpbronnen product) van de productpagina van Rotor-Gene AssayManager v2.1 op www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx.

Voor meer informatie over de installatie van de Rotor-Gene AssayManager-basissoftware v2.1 raadpleegt u de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1). Voor meer informatie over aanvullende software op aangesloten computers raadpleegt u de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide* (Beknopte handleiding voor Rotor-Gene AssayManager v2.1).

* Indien van toepassing: Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument met een productiedatum van januari 2010 of later. De productiedatum kunt u afleiden uit het serienummer aan de achterzijde van het instrument. Het serienummer heeft de indeling "mmjjnnn", waarbij "mm" de cijfers van de productiemaand aanduidt, "jj" de laatste twee cijfers van het productiejaar en "nnn" de unieke instrument-ID.

Voor automatische interpretatie van de resultaten met de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit met Rotor-Gene AssayManager v2.1 moet de nieuwste Gamma-invoegtoepassing zijn geïnstalleerd op uw Rotor-Gene AssayManager v2.1. U vindt de nieuwste versie van de invoegtoepassing bij **Product Resources** (Hulpbronnen product) op de productpagina van Rotor-Gene AssayManager v2.1 op www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx.

Voor meer informatie over de installatie van de invoegtoepassing raadpleegt u het gedeelte "Installing plug-ins" (Invoegtoepassingen installeren) in de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1).

Voor de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit is bovendien een assayprofiel nodig. Dit assayprofiel bevat alle parameters die nodig zijn voor het uitvoeren van de cyclus en het analyseren van de qPCR-assay. Het CALR-assayprofiel (*ipsogen_CALR_blood_CE*) komt overeen met een .iap-bestand dat u van de productpagina van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit kunt downloaden via het tabblad **Product Resources** (Hulpbronnen product) bij **Protocol Files** (Protocolbestanden). Het assayprofiel moet worden geïmporteerd in versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software.

Voor meer informatie over de installatie van de Gamma-invoegtoepassing en het assayprofiel raadpleegt u de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1) en de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Gebruikershandleiding van de Gamma-invoegtoepassing voor Rotor-Gene AssayManager v2.1).

1. Download de Gamma-invoegtoepassing en de nieuwste versie van het CALR-assayprofiel van www.qiagen.com.
2. Start de installatie door te dubbelklikken op het bestand **RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi**. Volg de installatie-instructies op het scherm.

Voor een gedetailleerde beschrijving raadpleegt u het gedeelte “Installing plug-ins” (Invoegtoepassingen installeren) in de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basis-toepassing v2.1).

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

- Selecteer het tabblad **Settings** (Instellingen) in de omgeving **Configuration** (Configuratie).
- Schakel in het deelvenster **Work list** (Werklijst) bij **Closed mode** (Gesloten modus) de volgende selectievakjes in: **Material number required** (Materiaalnummer vereist), **Valid expiry date required** (Geldige vervaldatum vereist) en **Lot number required** (Partijnummer vereist).

Alleen een gebruiker met administratorrechten kan dit doen.

3. Zodra de Gamma-invoegtoepassing is geïnstalleerd, importeert u het CALR-assayprofiel (.iap-bestand).
Meld u bij versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software aan als gebruiker met administratorrechten voor Rotor-Gene AssayManager v2.1.
4. Selecteer de omgeving **Configuration** (Configuratie).
5. Selecteer het tabblad **Assay Profiles** (Assayprofielen).
6. Klik op de knop **Import** (Importeren).
7. Selecteer in het dialoogvenster het CALR-assayprofielbestand ipsogen_CALR_blood_CE dat u wilt openen.
8. Klik op **Open** (Openen). Het assayprofiel wordt geladen en toegevoegd aan de lijst met beschikbare assayprofielen. Het kan nu worden gebruikt in de omgeving **Setup** (Instellen).

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

Een laadblok en rotor instellen

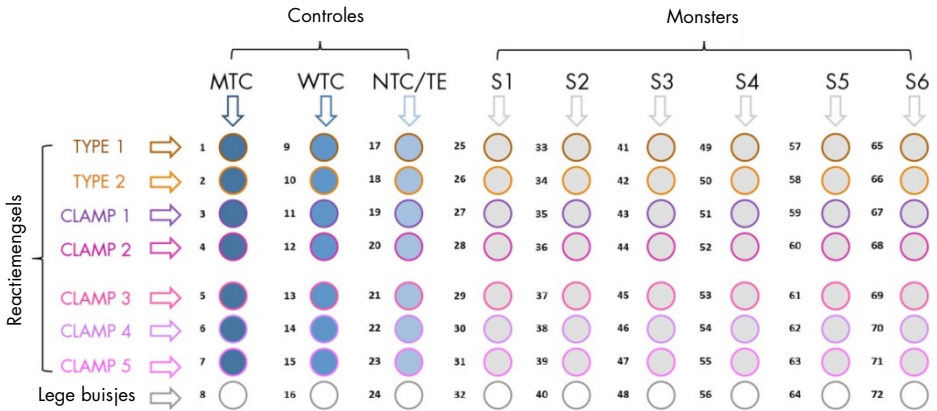
We raden aan om 6 gDNA-monsters te testen in dezelfde proef om zo het gebruik van de controles en reactiemengsels te optimaliseren.

Elk reactiemengsel (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 en CALR CLAMP 5) wordt gebruikt voor 9 reacties: 6 monsters van gDNA en 3 externe controles [1 CALR-mutantcontrole (MTC), 1 CALR-wildtypecontrole (WTC) en 1 templateloze controle (NTC = TE-buffer uit de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit)].

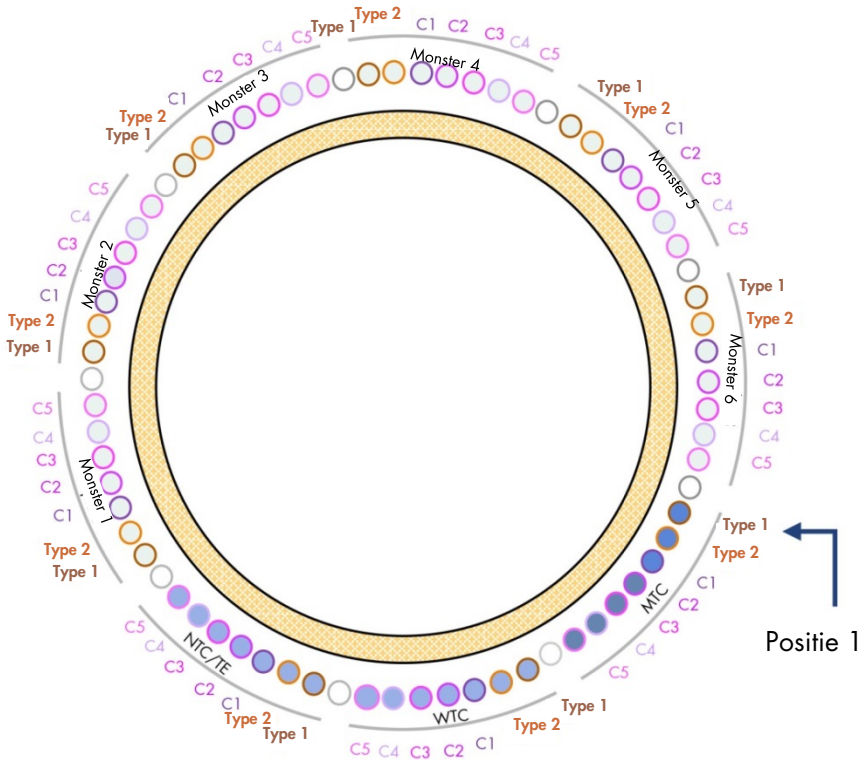
De schema's in afbeelding 4 en afbeelding 5 tonen een voorbeeld van de instelling van het laadblok en de rotor voor een geoptimaliseerde proef met de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit.

De positie van de CALR-reactiemengsels en -controles is ingesteld in het CALR-assayprofiel en kan niet worden gewijzigd. Als de reactiemengsels/-controles niet worden geplaatst zoals hieronder wordt geïnstrueerd, kan er geen automatische analyse van resultaten worden uitgevoerd.

De getallen in afbeelding 4 geven de posities in het laadblok en de uiteindelijke rotorpositie aan.




Afbeelding 4. Instelling van het laadblok voor een proef met de ipsogen CALR RGQ PCR Kit. TYPE 1: CALR-reactiemengsel TYPE 1; TYPE 2: CALR-reactiemengsel TYPE 2; CLAMP 1: CALR-reactiemengsel CLAMP 1; CLAMP 2: CALR-reactiemengsel CLAMP 2; CLAMP 3: CALR-reactiemengsel CLAMP 3; CLAMP 4: CALR-reactiemengsel CLAMP 4; CLAMP 5: CALR-reactiemengsel CLAMP 5; MTC: CALR-mutantcontrole; WTC: CALR-wildtypecontrole; NTC/TE: Templateloze controle (TE); S1–S6: gDNA-monsters.



Afbeelding 5. Instelling van de rotor voor een proef met de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit.

Vanaf positie 1: MTC: CALR-mutantcontrole; WTC: CALR-wildtypecontrole; NTC/TE: Templateloze controle (TE); Type 1: CALR-reactiemengsel TYPE 1; Type 2: CALR-reactiemengsel TYPE 2; C1: CALR-reactiemengsel CLAMP 1; C2: CALR-reactiemengsel CLAMP 2; C3: CALR-reactiemengsel CLAMP 3; C4: CALR-reactiemengsel CLAMP 4; C5: CALR-reactiemengsel CLAMP 5; Monster 1 t/m Monster 6: gDNA-monsters.

Opmerking: Alle resterende posities  dienen te worden gevuld met lege buisjes.

Een werklĳst maken

De algehele functies van de omgeving **Setup** (Instellen) en van "Creating/Editing a Work List" (Een werklĳst maken/bewerken) worden beschreven in de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1).

Opmerking: Het werklĳstbestand kan worden opgeslagen. U kunt de werklĳst maken voordat u de monsters in het instrument plaatst of zodra de proef is ingesteld in het instrument.

1. Schakel het Rotor-Gene Q MDx-instrument in.
2. Open versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software en meld u aan als gebruiker met de rol "Operator" in de gesloten modus.
3. Selecteer de omgeving **Setup** (Instellen).
4. Klik op de knop **New manual work list** (Nieuwe handmatige werklĳst) in het werklĳstoverzicht.
5. Selecteer het "CALR assay profile" (CALR-assayprofiel) uit de lijst met beschikbare assayprofielen.
6. Klik op **Move** (Verplaatsen) om het geselecteerde assayprofiel te verplaatsen naar de lijst **Selected assay profiles** (Geselecteerde assayprofielen). Het assayprofiel wordt nu weergegeven in de lijst **Selected assay profiles** (Geselecteerde assayprofielen).
7. Geef het aantal monsters op (maximaal 6) in het daarvoor bestemde veld.
8. Selecteer de stap **Kit Information** (Informatie over de kit). Gebruik de streepjescode van de kit of geef handmatig de volgende informatie op die op het deksel van de doos van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit staat:
 - Materiaalnummer 1100703
 - Geldige vervaldatum
 - Partijnummer

9. Selecteer de stap **Samples** (Monsters). Er wordt een lijst met monsterdetails weergegeven. Deze lijst staat voor de verwachte indeling van de rotor.
10. Geef de monster-ID's op in deze lijst. Voer eventueel ook extra informatie en opmerkingen over de monsters in.
11. Selecteer **Properties** (Eigenschappen) en voer een naam voor de werklijst in.
12. Schakel het selectievakje **Worklist is complete (can be applied)** (Werklijst is volledig (kan worden toegepast)) in.
13. Sla de werklijst op met **Save** (Opslaan).
14. Druk op **Print work list** (Werklijst afdrukken) om de werklijst af te drukken. Een afgedrukte werklijst kan handig zijn bij het voorbereiden en instellen van de qPCR. De monsterdetails maken deel uit van de werklijst.

De qPCR instellen

Wat u moet doen voor u begint

- Ontdooi alle benodigde componenten, behalve de *Taq* DNA-polymerase; dit enzym moet u in de vriezer bewaren wanneer het niet wordt gebruikt. Plaats de buisjes met componenten die u wilt ontdooien op ijs of gebruik een koelblok om ze te koelen.
 - Reinig het gedeelte van de tafel waar u het PCR-mengsel bereidt om het risico van contaminatie van de template of nucleasen te verkleinen.
 - Voorafgaand aan gebruik dient u de buisjes met de standaarden, controles en reactiemengsels te vortexen (10–12 seconden) en kort te centrifugeren.
1. Bereid qPCR-mastermengsels voor elk reactiemengsel (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 en CALR CLAMP 5) **op ijs** (of met een koelblok) conform het aantal monsters dat u wilt verwerken.
Het pipetteerschema voor de bereiding van de mastermengsels van CALR-reagentia in de onderstaande tabel is berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25 µl na toevoeging van 5 µl gDNA of controle. Extra volume is opgenomen om te compenseren

voor pipetteerfouten en maakt de bereiding van een afdoende reactiemastermengsel voor 6 monsters plus 3 externe controles mogelijk.

Onderdeel	1 reactie (µl)	9 + 1 reacties (µl)*
CALR-reactiemengsel	19,83	198,3
Taq DNA-polymerase	0,17	1,7
Totaal volume qPCR-mastermengsel (µl)	20	200
Verdeling van qPCR-mastermengsels	20 µl per buisje	
Verdeling van monsters	5 µl per buisje	
Totaal volume qPCR-reactiemengsel	25 µl	

* Het extra reactievolume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

Opmerking: We raden aan dat u geen volumes kleiner dan 1 µl pipetteert.

- Vortex alle qPCR-mengsels en centrifugeer deze kort.
- Plaats de qPCR-stribbuisjes op een gekoeld laadblok voor 72 buisjes van 0,1 ml en pipetteer 20 µl CALR qPCR-mastermengsel per stribbuisje conform de instelling van het laadblok die in Afbeelding 4 wordt getoond.
- Vortex de gDNA-monsters, CALR-wildtypecontrole (WTC), CALR-mutantcontrole (MTC) en TE-buffer (NTC) en centrifugeer deze kort. Voeg vervolgens conform de instelling in Afbeelding 4 5 µl monster of controle materiaal toe aan het desbetreffende buisje voor een totaalvolume van 25 µl. Meng door de pipet voorzichtig op en neer te bewegen.

Opmerking: Verwissel voor elk buisje de tip, zodat u fout-positieve resultaten ten gevolge van niet-specifieke contaminatie van de template of het reactiemengsel voorkomt. Sluit alle buisjes en controleer of er geen luchtballen onder in de buisjes zitten.

- Plaats alle componenten van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit terug in de juiste bewaarcondities om te voorkomen dat het materiaal degradeert.

De Rotor-Gene MDx voorbereiden en de qPCR-run starten

1. Plaats een rotor met 72 putjes op de Rotor-Gene Q MDx-rotorhouder.
2. Vul de rotor met stripbuisjes conform de toegewezen posities. Start daarbij bij positie 1, zoals staat aangeduid in Afbeelding 5. In alle ongebruikte posities dienen lege stripbuisjes met dop te worden geplaatst.

Opmerking: Zorg ervoor dat het eerste buisje op positie 1 wordt geplaatst en dat de stripbuisjes in de juiste richting worden geplaatst op de posities die in Afbeelding 4 en Afbeelding 5 worden weergegeven.

Opmerking: Houd het TYPE 1-reactiemengsel en de drie controles (MTC, WTC, NTC) altijd in de posities 1, 9 en 17, zodat de gainoptimalisatie (uitgevoerd op buisjes-positie 1) altijd met dezelfde amplificatie wordt uitgevoerd (zie Afbeelding 4 en Afbeelding 5).

3. Maak de vergrendelingsring vast.
4. Plaats de rotor en vergrendelingsring in het Rotor-Gene Q MDx-instrument. Sluit het deksel van het instrument.
5. Selecteer in versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software de desbetreffende werklijst in het werklijstoverzicht en klik op **Apply** (Toepassen).

Als de werklijst nog open is, kunt u direct op de knop **Apply** (Toepassen) klikken.

Opmerking: Als er nog geen werklijst speciaal voor de proef is gemaakt, meldt u zich aan bij Rotor-Gene AssayManager v2.1 en volgt u de stappen in “Een werklijst maken” op pagina 38 voordat u verdergaat.

6. Voer een naam in voor de proef.
7. Selecteer in het gedeelte **Cycler selection** (Cycler selecteren) de cycler die u wilt gebruiken. Gebruik een Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-cycler.
8. Controleer of de vergrendelingsring correct is bevestigd en bevestig op het scherm dat de vergrendelingsring is bevestigd.
9. Klik op **Start run** (Run starten).

De qPCR-run start.

10. Zodra de run is voltooid, klikt u op **Finish run** (Run beëindigen).

Opmerking: De proef wordt pas opgeslagen in de interne database wanneer deze stap is voltooid.

qPCR-resultaten vrijgeven en rapporteren

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

Nadat een run is voltooid en de cyclus is vrijgegeven, wordt de proef opgeslagen in de interne database. De analyse van de verzamelde gegevens wordt automatisch uitgevoerd, afhankelijk van de invoegtoepassing voor het assayprofiel en de regels en parameterwaarden die voor het assayprofiel zijn gedefinieerd.

Opmerking: Een gebruiker moet de rol "Approver" (Goedkeurder) hebben om een run te kunnen goedkeuren.

De eerste stap van het goedkeuringsproces is om de assay te filteren die moet worden goedgekeurd. Dit doet u met de filtercriteria van de omgeving **Approval** (Goedkeuring).

1. Geef de run vrij en keur deze goed.

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

Een gebruiker die is ingelogd met de rol "Operator", kan klikken op **Release** (Vrijgeven).

Als op **Release and go to approval** (Vrijgeven en naar goedkeuring gaan) is geklikt, worden de resultaten van de proef weergegeven in de omgeving **Approval** (Goedkeuring).

Als op **Release** (Vrijgeven) is geklikt door een gebruiker met de rol "Operator", dient iemand met de rol "Approver" (Goedkeurder) zich aan te melden en de omgeving **Approval** (Goedkeuring) te selecteren.

2. Selecteer de filteropties voor de assay die moet worden goedgekeurd en klik op **Apply** (Toepassen).
3. Controleer de resultaten en klik op de knop **Release/Report data** (Gegevens vrijgeven/rapporteren).
4. Klik op **OK**.

Het rapport wordt gegenereerd in PDF-indeling en wordt automatisch opgeslagen in de vooraf gedefinieerde map.

Het standaard mappad is **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports**.

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

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

Opmerking: Om te kunnen helpen met het oplossen van problemen, heeft de technische ondersteuning van QIAGEN een ondersteuningspakket van de run nodig. U kunt een ondersteuningspakket genereren in de omgeving **Approval** (Goedkeuring) of **Archive** (Archiveren). Zie "Creating a support package" (Een ondersteuningspakket maken) in de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1) voor meer informatie.

Naast het ondersteuningspakket kan de audittrail vanaf het moment van het voorval ± 1 dag handig zijn. De audittrail kunt u downloaden in de omgeving **Service**. Zie de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1) voor meer informatie.

Interpretatie van de resultaten

Gegevensanalyse

De analyse van de qPCR-resultaten voor elke afzonderlijke assay en elk afzonderlijk monster geschiedt volledig automatisch. Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyseert amplificatiecurves en verklaart mogelijk niet-overeenstemmende curves ongeldig, afhankelijk van de vorm en ruisamplitude. Als dit het geval is, wordt de ongeldige curve gemarkeerd. Er kunnen ook waarschuwingen worden weergegeven voor afwijkingen die de curve niet ongeldig maken.

Om de geldigheid van de assay te bepalen, analyseert Rotor-Gene AssayManager v2.1 ook de runcontroles, dat wil zeggen de CALR-wildtypecontrole (WTC), CALR-mutantcontrole (MTC) en TE-buffer (NTC) in de groene (FAM) en gele (HEX) kanalen voor de reactiemengsels van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 en CALR CLAMP 5). Of een controle geldig is, hangt af van de overeenstemming van de C_T -waarden met vooraf gedefinieerde specificaties.

Opmerking: Als de interne amplificatiecontrole in een bepaald buisje ongeldig is (geel kanaal), wordt het CALR-specifieke doel in hetzelfde buisje (groen kanaal) als ongeldig beschouwd.

Opmerking: Als minstens één externe controle van een bepaalde CALR-assay (bijvoorbeeld CLAMP 1-assay) ongeldig is, worden alle testmonsters die met dat reactiemengsel zijn verkregen als ongeldig beschouwd. In dit geval is alleen de CALR-assay ongeldig en niet de gehele qPCR-run.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyseert ook onbekende monsters door de geldigheid van de interne ABL1-controle te controleren.

Tot slot wordt een *CALR*-status toegekend aan onbekende monsters. In het eerste geval bekijkt de software de resultaten die zijn verkregen voor de TYPE 1- en TYPE 2-assays. Als een positieve mutatiestatus van type 1 of type 2 aan een monster wordt toegekend, wordt de *CALR*-status bepaald. De resultaten die zijn verkregen voor de CLAMP-assays worden dan ter informatie weergegeven.

Als noch mutatie van type 1 noch mutatie van type 2 wordt vastgesteld, wordt de analyse voortgezet met de resultaten die zijn verkregen voor de CLAMP-assays, totdat de *CALR*-status is vastgesteld (dat wil zeggen of er wel of geen mutatie is gedetecteerd).

Om te kunnen concluderen dat een monster positief is, is detectie door ten minste één van de zeven *CALR*-assays vereist. Alle controles die aan de desbetreffende assay(s) zijn gerelateerd en de controle in het geteste monster moeten geldig zijn, dat wil zeggen MTC, WTC, NTC en interne ABL1-controle.

Om te kunnen concluderen dat een monster negatief is, moet het monster negatief zijn bij alle assays en moeten alle controles (MTC, WTC en NTC) van alle zeven *CALR*-assays en de interne ABL1-controle van het monster geldig zijn.

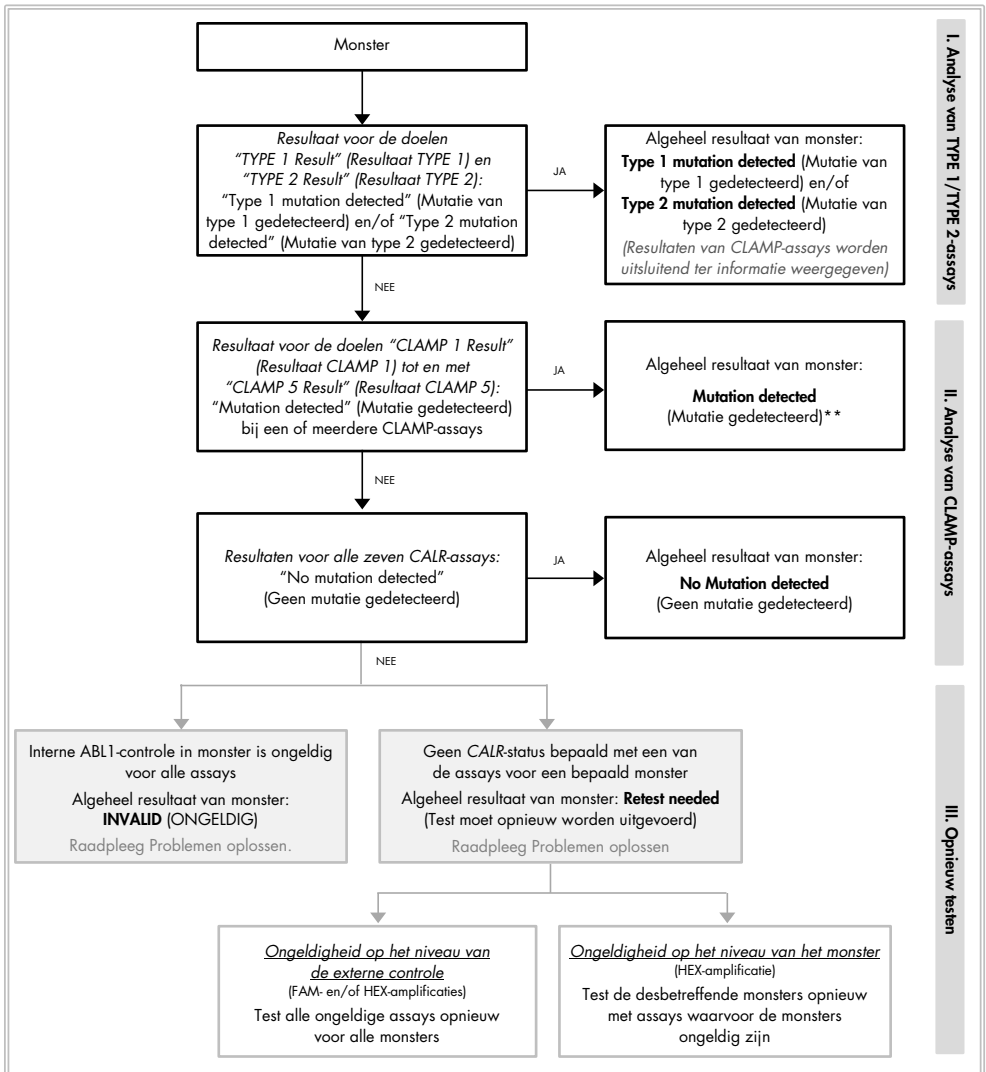
De resultaten van de testmonsters die automatisch zijn geanalyseerd en ingesteld door versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software, moeten worden goedgekeurd en vrijgegeven door een gebruiker die is aangemeld met de rol "Approver" (Goedkeurder). Er staan bij monsterresultaten die moeten worden goedgekeurd drie extra goedkeuringsknoppen aan het eind van de bijbehorende rij. Met deze knoppen kunnen de monsterresultaten interactief worden geaccepteerd of afgekeurd. Raadpleeg de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Gebruikershandleiding van de Gamma-invoegtoepassing voor Rotor-Gene AssayManager v2.1) voor meer informatie.

Indien er ongeldige resultaten zijn, raadpleegt u "Problemen oplossen" op pagina 57 om de oorzaak van het probleem te onderzoeken en mogelijk fouten te identificeren die verholpen moeten worden.

Nieuwe proeven

Indien er ongeldige resultaten zijn, volgt u het stroomdiagram in afbeelding 6 om te beoordelen of het nodig is nieuwe proeven uit te voeren.

Het is in principe niet nodig nieuwe proeven uit te voeren indien met een van de zeven CALR-assays een *CALR*-status kon worden toegekend aan de desbetreffend monsters.



* Indien identificatie van type 1/type 2 verplicht is en de assays van TYPE 1 en/of TYPE 2 ongeldig zijn, ondanks een positieve CLAMP-assay, zijn mogelijk nieuwe proeven nodig om een overtuigend resultaat voor de TYPE 1- en/of TYPE 2-assays te verkrijgen.

Afbeelding 6. Stroomdiagram voor besluitvorming om de CALR-mutatiestatus van testmonsters te bepalen.

Opmerking: Indien identificatie van type 1/type 2 verplicht is en de assays van TYPE 1 en/of TYPE 2 ongeldig zijn, ondanks een positieve CLAMP-assay, zijn mogelijk nieuwe proeven nodig om een overtuigend resultaat voor de TYPE 1- en/of TYPE 2-assays te verkrijgen.

Mogelijk zijn in andere gevallen nieuwe proeven nodig. Wanneer u nieuwe proeven uitvoert, moet u het TYPE 1-reactiemengsel en de drie controles (MTC, WTC, NTC) altijd in de posities 1, 9 en 17 houden, zodat de gainoptimalisatie (uitgevoerd op buisjespositie 1) altijd met dezelfde amplificatie wordt uitgevoerd. Plaats elke opnieuw geteste assay in de daarvoor bestemde positie (Afbeelding 4), zelfs als niet alle assays aanwezig zijn op de plaat.

Opmerking: Als enkele van de zeven CALR-assays ontbreken wanneer de monsters opnieuw worden getest, veroorzaken alle lege posities die normaal gesproken gevuld zijn de reactie "INVALID" (ONGELDIG) in de software. Voor betere traceerbaarheid moeten de lege posities en de verwachte aard van de bijbehorende reactie worden gedocumenteerd in het gedeelte met opmerkingen van het rapport.

Weergave van resultaten

Doelen

De resultaten voor elke assay van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit worden weergegeven bij de volgende doelnamen:

- "ABL_AssayName" (ABL_Assaynaam, bijvoorbeeld ABL_TYPE_1) voor de interne ABL1-amplificatiecontrole (resultaten van geel kanaal)
- "AssayName" (Assaynaam) voor een CALR-reactiemengsel (bijvoorbeeld TYPE 1 voor het CALR-reactiemengsel TYPE 1) (resultaten van groen kanaal)

- “AssayName Result” (Resultaat assaynaam) (bijvoorbeeld TYPE 1 Result (Resultaat TYPE 1)). Deze doelen betreffen gecombineerde doelen; het bijbehorende resultaat houdt rekening met de geldigheid van de controles (MTC, WTC, NTC en ABL1).

Resultaten

De resultaten voor de bovenstaande doelen worden weergegeven in de kolom **Result** (Resultaten) van het rapport.

Tabel 3. Weergegeven resultaten voor elk doel

Doel	Monsters	Weergegeven resultaten
ABL_AssayName (ABL_Assaynaam) (bijvoorbeeld ABL_TYPE_1)	MTC, WTC, NTC, Test samples (Testmonsters)	Internal Control Valid (Interne controle geldig), INVALID (ONGELDIG)
AssayName (Assaynaam) (bijvoorbeeld TYPE 1)	MTC, WTC, NTC	Signal (Signaal), No Signal (Geen signaal), INVALID (ONGELDIG)
AssayName (Assaynaam) (bijvoorbeeld TYPE 1)	Test samples (Testmonsters)	Significant Amplification Detected (Significante amplificatie gedetecteerd), No Significant Amplification Detected (Geen significante amplificatie gedetecteerd), No Amplification Detected (Geen amplificatie gedetecteerd), INVALID (ONGELDIG)
TYPE 1 Result (Resultaat TYPE 1)	Test samples (Testmonsters)	Type 1 Mutation Detected, (Mutatie van type 1 gedetecteerd) No Mutation Detected (Geen mutatie gedetecteerd), INVALID (ONGELDIG)
TYPE 2 Result (Resultaat TYPE 2)	Test samples (Testmonsters)	Type 2 Mutation Detected, (Mutatie van type 2 gedetecteerd) No Mutation Detected (Geen mutatie gedetecteerd), INVALID (ONGELDIG)

Doel	Monsters	Weergegeven resultaten
CLAMP X Result (Resultaat CLAMP X) (bijvoorbeeld CLAMP 1 Result (Resultaat CLAMP 1))	Test samples (Testmonsters)	Mutation Detected (Mutatie gedetecteerd), No Mutation Detected (Geen mutatie gedetecteerd), INVALID (ONGELDIG)

Als een van de controles (MTC, WTC, NTC) die aan een bepaald monster is gekoppeld, ongeldig is voor een bepaalde assay of als de interne ABL1-controle ongeldig is, dan is het resultaat dat wordt weergegeven voor het gecombineerde doel "INVALID" (ONGELDIG).

De conclusie van de analyse voor elk monster wordt weergegeven in de kolom **Overall Sample Result** (Algeheel resultaat van monster) van het rapport.

Tabel 4. Algehele resultaten van monster

Monsterresultaat	Beschrijving
Type 1 Mutation Detected (Mutatie van type 1 gedetecteerd)	Het geteste monster vertoont <i>CALR</i> -mutatie van type 1.
Type 2 Mutation Detected (Mutatie van type 2 gedetecteerd)	Het geteste monster vertoont <i>CALR</i> -mutatie van type 2.
Type 1 and Type 2 Mutation Detected (Mutatie van type 1 en type 2 gedetecteerd)	Het geteste monster vertoont <i>CALR</i> -mutaties van type 1 en type 2. Dit is zeldzaam, maar is één keer waargenomen tijdens de klinische validatie van de <i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit.
Mutation Detected (Mutatie gedetecteerd)	Het geteste monster vertoont een andere <i>CALR</i> -mutatie dan type 1 of type 2.

Monsterresultaat	Beschrijving
No Mutation Detected (Geen mutatie gedetecteerd)	Er is geen <i>CALR</i> -mutatie gedetecteerd in het geteste monster.
Retest needed (Test moet opnieuw worden uitgevoerd)	Het resultaat is onduidelijk doordat een of meer controles voor een of meer <i>CALR</i> -reactiemengsels ongeldig zijn. De test moet opnieuw worden uitgevoerd om een definitief resultaat te vinden (zie afbeelding 6). Voorbeeld: Een monster is enkel voor de CLAMP 1-assay positief (d.w.z. "Significant Amplification Detected" (Significante amplificatie gedetecteerd)), maar de NTC voor de CLAMP 1-assay is ongeldig door besmetting in het putje. Het monsterresultaat voor CLAMP 1 kan niet worden meegenomen in de resultaten, zodat het resultaat van CLAMP 1 wordt weergegeven als INVALID (ONGELDIG). Voor de CLAMP 1-assay moet een nieuwe test worden uitgevoerd (MTC, WTC, NTC en het desbetreffende monster) om een positief resultaat voor het monster te behalen.
INVALID (ONGELDIG)	De interne <i>ABL1</i> -amplificatiecontrole is voor alle zeven <i>CALR</i> -reactiemengsels ongeldig voor het geteste monster, terwijl alle externe controles (MTC, WTC, NTC) geldig zijn. Dit heeft waarschijnlijk te maken met de kwaliteit van het monster of een incorrecte monsternormalisatie. Zie "Problemen oplossen" op pagina 57 voor meer informatie.

Waarschuwingen

Waarschuwingen worden weergegeven om extra informatie over de verkregen resultaten te geven, met name over ongeldige resultaten. Afwijkingen die geen problemen vormen, kunnen een waarschuwing genereren zonder dat deze tot ongeldige resultaten leiden. Raadpleeg de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Gebruikershandleiding van de Gamma-invoegtoepassing voor Rotor-Gene AssayManager v2.1) voor informatie over universele waarschuwingen.

De automatische analyse van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit-assay zou de volgende assayspecifieke en universele waarschuwingen kunnen opleveren:

Waarschuwing	Beschrijving
Assayspecifieke waarschuwingen	
CONSECUTIVE_FAULT	Een doel dat voor de berekening voor dit doel is gebruikt, is ongeldig.
IC_INVALID	De interne controle is ongeldig. Het doel en de interne controle delen hetzelfde buisje.
INVALID_SIGNAL	Waarschuwing die specifiek geldt voor de NTC. De C _T -waarde is te laag voor de interne controle of de CALR-specifieke amplificatie.
MC_HIGH_CT (CLAMP X)	De C _T -waarde is te hoog voor de mutantcontrole.
MC_HIGH_CT (TYPE X)	De C _T -waarde is te hoog voor de mutantcontrole.
MC_IC_HIGH_CT (CLAMP X)	De C _T -waarde is hoger dan verwacht voor de interne controle in het buisje met de mutantcontrole.
MC_IC_HIGH_CT (TYPE X)	De C _T -waarde is hoger dan verwacht voor de interne controle in het buisje met de mutantcontrole.
MC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	De C _T -waarde is lager dan verwacht voor de interne controle in het buisje met de mutantcontrole.
MC_IC_LOW_CT (TYPE X)	De C _T -waarde is lager dan verwacht voor de interne controle in het buisje met de mutantcontrole.
MC_LOW_CT (CLAMP X)	De C _T -waarde is te laag voor de mutantcontrole.

Waarschuwing	Beschrijving
MC_LOW_CT (TYPE X)	De C _T -waarde is te laag voor de mutantcontrole.
MC_NO_CT (CLAMP X)	Er is geen C _T detecteerbaar voor de mutantcontrole met het CLAMP X-reactiemengsel.
MC_NO_CT (TYPE X)	Er is geen C _T detecteerbaar voor de mutantcontrole met het TYPE X-reactiemengsel.
NO_SIGNAL_IC_INVALID	Er wordt geen signaal van de interne controle gedetecteerd. Het doel en de interne controle delen hetzelfde buisje.
NTC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	De C _T -waarde is te laag voor de interne controle in het buisje met de templateloze controle.
NTC_IC_LOW_CT (TYPE X)	De C _T -waarde is te laag voor de interne controle in het buisje met de templateloze controle.
NTC_LOW_CT (CLAMP X)	De C _T -waarde is te laag voor de templateloze controle.
NTC_LOW_CT (TYPE X)	De C _T -waarde is te laag voor de templateloze controle.
SAMPLE_CLAMP_X_IC_HIGH_CT	De C _T -waarde is hoger dan verwacht voor de interne controle in een buisje met een monster.
SAMPLE_CLAMP_X_IC_LOW_CT	De C _T -waarde is lager dan verwacht voor de interne controle in een buisje met een monster.

Waarschuwing	Beschrijving
SAMPLE_TYPE X_IC_HIGH_CT	De C _T -waarde is hoger dan verwacht voor de interne controle in een buisje met een monster.
SAMPLE_TYPE X_IC_LOW_CT	De C _T -waarde is lager dan verwacht voor de interne controle in een buisje met een monster.
WTC_IC_HIGH_CT (CLAMP X)	De C _T -waarde is hoger dan verwacht voor de interne controle in het buisje met de WT-controle.
WTC_IC_HIGH_CT (TYPE X)	De C _T -waarde is hoger dan verwacht voor de interne controle in het buisje met de WT-controle.
WTC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	De C _T -waarde is lager dan verwacht voor de interne controle in het buisje met de WT-controle.
WTC_IC_LOW_CT (TYPE X)	De C _T -waarde is lager dan verwacht voor de interne controle in het buisje met de WT-controle.
WTC_LOW_CT (CLAMP X)	De C _T -waarde is te laag voor de WT-controle.
WTC_LOW_CT (TYPE X)	De C _T -waarde is te laag voor de WT-controle.
Andere waarschuwingen	
ANALYSIS_FAILED	Assay is ingesteld als ongeldig, omdat de analyse om verschillende redenen is mislukt. Neem contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN.

Waarschuwing

Beschrijving

CURVE_SHAPE_ANOMALY	De amplificatiecurve met onbewerkte gegevens heeft een vorm die afwijkt van het normale gedrag van deze assay. Er is een grote kans dat er sprake is van incorrecte resultaten of incorrecte interpretatie van resultaten.
FLAT_BUMP	De amplificatiecurve met onbewerkte gegevens heeft de vorm van een platte bobbel die afwijkt van het normale gedrag van deze assay. Er is een grote kans dat er sprake is van incorrecte resultaten of incorrecte interpretatie van resultaten (zoals een onjuist vastgestelde C _T -waarde).
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE (Waarschuwing)	Het percentage fluorescentiewijziging van dit monster ten opzichte van het monsterbuisje met de grootste fluorescentiewijziging is kleiner dan een opgegeven limiet.
NO_BASELINE	Er is geen basisniveau gevonden. Er kan geen verdere analyse worden uitgevoerd.
RUN_FAILED	De assay is ingesteld als ongeldig vanwege een probleem met de cycler of de aansluiting van de cycler.
RUN_STOPPED	De assay is ingesteld als ongeldig, omdat de run handmatig is gestopt.

Waarschuwing	Beschrijving
SATURATION	De fluorescentie van onbewerkte gegevens raakt sterk verzadigd voor het buigpunt van de amplificatiecurve.
SPIKE	Er is in de fluorescentie van onbewerkte gegevens een piek gedetecteerd in de amplificatiecurve, maar buiten de regio waar de C_T is bepaald.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Er is in de amplificatiecurve een piek gedetecteerd dicht bij de C_T .
STEEP_BASELINE	Er is in de amplificatiecurve een snelle stijging in het basisniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van onbewerkte gegevens.
STRONG_BASELINE_DIP	Er is in de amplificatiecurve een sterke daling in het basisniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van onbewerkte gegevens.
STRONG_NOISE	Er is sterke ruis gedetecteerd buiten de groeifase van de amplificatiecurve.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Er is sterke ruis gedetecteerd in de groeifase (exponentiële fase) van de amplificatiecurve.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Er is in de amplificatiecurve een golfing in het basisniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van onbewerkte gegevens.

Problemen oplossen

Dit gedeelte over problemen oplossen kan handig zijn om eventuele problemen op te lossen die zich kunnen voordoen bij de beoordeling van de *CALR*-mutatiestatus met behulp van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit. Zie de achterzijde voor contactgegevens of ga naar www.qiagen.com.

Raadpleeg de desbetreffende handleidingen voor informatie over het oplossen van problemen met betrekking tot de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104) of QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236).

Voor informatie over het oplossen van problemen met het Rotor-Gene Q MDx-instrument en versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software raadpleegt u de desbetreffende gebruikershandleidingen.

Opmerkingen en suggesties

Een monster wordt bij meerdere assays als positief gedetecteerd

Een bepaalde mutatie kan door verschillende assays worden gedetecteerd

Het komt bijvoorbeeld veel voor dat een monster met een mutatie van type 1 wordt geamplificeerd door zowel de CLAMP 1- en CLAMP 2-assays als de TYPE 1-assay. Het komt bij een monster met een mutatie van type 2 vaak voor dat er amplificatie is met zowel de CLAMP 5-assay als de TYPE 2-assay.

Opmerkingen en suggesties

Geen of zwakke amplificatie van de interne amplificatiecontrole in externe controles en/of monsters

- | | |
|---|--|
| a) Reactiemengsel en/of Taq DNA-polymerase en/of template niet toegevoegd | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Controleer of alle template-DNA en alle componenten van het qPCR-mastermengsel zijn toegevoegd. Herhaal de PCR-run. |
| b) Reactiemengsel is gedegradeerd | Bewaar de inhoud van de kit bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C en bescherm de reactiemengsels tegen licht.
Controleer de bewaarcondities en vervaldatum (raadpleeg het etiket) van de reagentia en gebruik indien nodig een nieuwe kit om de PCR-run te herhalen. |
| c) Mogelijk is het pipetteervolume onjuist | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Controleer of een volume van 5 µl van de controle/het monster en een volume van 20 µl van het qPCR-mastermengsel zijn toegevoegd. Inspecteer alle gepipetteerde volumes visueel.
Controleer de pipetten en kalibreer deze indien nodig opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt. |

Opmerkingen en suggesties

- d) DNA-concentratie is te laag
Controleer de DNA-concentratie van het monster. De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit is geoptimaliseerd voor een werkconcentratie van 10 ng/μl DNA. Als de DNA-concentratie lager is dan 10 ng/μl, concentreert u het DNA of extraheert u het uit volbloed, waarbij u een lager elutievolume gebruikt, voordat u de qPCR-stap herhaalt.
- e) Proteïnecontaminatie van het DNA of de aanwezigheid van organische chemicaliën
Controleer de verhouding A_{260}/A_{280} . De verhouding A_{260}/A_{280} moet $\geq 1,7$ zijn. Als de verhouding $< 1,7$ is, voert u een nieuwe DNA-extractie uit en herhaalt u de PCR-run.

Vroege amplificatie van de interne amplificatiecontrole in externe controles en/of monsters

- a) DNA-concentratie is te hoog
Controleer de DNA-concentratie van het monster. De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit is geoptimaliseerd voor een werkconcentratie van 10 ng/μl. Als de DNA-concentratie hoger is dan 10 ng/μl, verdunt u het DNA in TE-buffer en herhaalt u de PCR-run.
- b) Mogelijk is het pipetteervolume onjuist
Controleer het pipetteschema en de instellingen van de reactie. Controleer of een volume van 5 μl van de controle/het monster en een volume van 20 μl van het qPCR-mastermengsel zijn toegevoegd. Inspecteer alle gepipetteerde volumes visueel.
Controleer de pipetten en kalibreer deze indien nodig opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt.

Opmerkingen en suggesties

- c) Mogelijk is de amplificatiecurve onjuist. Controleer de bijbehorende amplificatie op ongebruikelijke curves. Herhaal de PCR-run.

Geen of zwakke signalen voor de interne amplificatiecontrole in monsters, maar de externe controles zijn geldig

- a) DNA-concentratie is te laag. Controleer de DNA-concentratie van het monster. De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit is geoptimaliseerd voor een werkconcentratie van 10 ng/ μ l DNA. Als de DNA-concentratie lager is dan 10 ng/ μ l, concentreert u het DNA of extraheert u het uit volbloed, waarbij u een lager elutievolume gebruikt, voordat u de qPCR-stap herhaalt.
- b) Proteïnecontaminatie van het DNA of de aanwezigheid van organische chemicaliën. Controleer de verhouding A_{260}/A_{280} . De verhouding A_{260}/A_{280} moet $\geq 1,7$ zijn. Als de verhouding $< 1,7$ is, voert u een nieuwe DNA-extractie uit en herhaalt u de PCR-run.
- c) Mogelijk is het pipetteervolume onjuist. Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Controleer of een volume van 5 μ l van de controle/het monster en een volume van 20 μ l van het qPCR-mastermengsel zijn toegevoegd. Inspecteer alle gepipetteerde volumes visueel. Controleer de pipetten en kalibreer deze indien nodig opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt.

Opmerkingen en suggesties

Templateloze controle (NTC/TE-buffer) is positief (FAM en/of HEX)

- a) Kruiscontaminatie of contaminatie van reagentia
- Vervang alle kritieke reagentia en herhaal de PCR-run. Hanteer monsters, componenten van kits en verbruiksartikelen altijd conform aanbevolen methoden ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven materiaal.
- Zorg ervoor dat de tips worden verwisseld voordat een andere reagens wordt gepipetteerd of wanneer andere buisjes worden geplaatst.
- Bereid het mastermengsel vóór PCR met speciaal daarvoor bestemde materialen (pipetten, tips, etc.).
- Bereid het mastermengsel vóór PCR en de NTC-reactie in een speciaal daarvoor bestemde ruimte waar geen DNA-matrijzen (DNA, plasmiden of PCR-producten) kunnen worden geïntroduceerd.
- Sluit indien mogelijk de PCR-buisjes direct nadat het te testen monster is toegevoegd.
- b) Omkering van stripbuisjes en/of monster-ID's
- Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Herhaal de PCR-run.

Opmerkingen en suggesties

- c) Het reactiemengsel of de probe is gedegradeerd
- Bewaar de inhoud van de kit bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C en bescherm de reactiemengsels tegen licht.
- Controleer de bewaarcondities en vervaldatum (raadpleeg het etiket) van de reagentia en gebruik indien nodig een nieuwe kit om de PCR-run te herhalen.
- d) Mogelijk is de amplificatiecurve onjuist
- Controleer de bijbehorende amplificatie op ongebruikelijke curves.
- Herhaal de PCR-run.

Geen of zwakke amplificatie van de mutantcontrole (MTC) (FAM-amplificatie)

- a) Reactiemengsel en/of Taq DNA-polymerase niet toegevoegd
- Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Controleer of alle componenten van het qPCR-mastermengsel zijn toegevoegd. Herhaal de PCR-run.
- b) Reactiemengsel is gedegradeerd
- Bewaar de inhoud van de kit bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C en bescherm de reactiemengsels tegen licht.
- Controleer de bewaarcondities en vervaldatum (raadpleeg het etiket) van de reagentia en gebruik indien nodig een nieuwe kit om de PCR-run te herhalen.

Opmerkingen en suggesties

- c) Omkering van stripbuisjes en/of monster-ID's Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Herhaal de PCR-run.
- d) Mogelijk is het pipetteervolume onjuist Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Controleer of een volume van 5 μ l van de controle/het monster en een volume van 20 μ l van het qPCR-mastermengsel zijn toegevoegd. Inspecteer alle gepipetteerde volumes visueel.
Controleer de pipetten en kalibreer deze indien nodig opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt.

Vroege amplificatie van de mutantcontrole (MTC) (FAM-amplificatie)

- a) Mogelijk is het pipetteervolume onjuist Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Controleer of een volume van 5 μ l van de controle/het monster en een volume van 20 μ l van het qPCR-mastermengsel zijn toegevoegd. Inspecteer alle gepipetteerde volumes visueel.
Controleer de pipetten en kalibreer deze indien nodig opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt.
- b) Mogelijk is de amplificatiecurve onjuist Controleer de bijbehorende amplificatie op ongebruikelijke curves. Herhaal de PCR-run.
- c) Omkering van stripbuisjes en/of monster-ID's Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Herhaal de PCR-run.

Opmerkingen en suggesties

Vroege amplificatie van de wildtypecontrole (WTC) (FAM-amplificatie)

- | | |
|---|--|
| a) Reactiemengsel is gedegradeerd | Bewaar de inhoud van de kit bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C en bescherm de reactiemengsels tegen licht.
Controleer de bewaarcondities en vervaldatum (raadpleeg het etiket) van de reagentia en gebruik indien nodig een nieuwe kit om de PCR-run te herhalen. |
| b) Mogelijk is het pipetteervolume onjuist | Controleer het pipetteschema en de instellingen van de reactie. Controleer of een volume van 5 µl van de controle/het monster en een volume van 20 µl van het qPCR-mastermengsel zijn toegevoegd. Inspecteer alle gepipetteerde volumes visueel.
Controleer de pipetten en kalibreer deze indien nodig opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt. |
| c) Omkering van stripbuisjes en/of monster-ID's | Controleer het pipetteschema en de instellingen van de reactie. Herhaal de PCR-run. |
| d) Mogelijk is de amplificatiecurve onjuist | Controleer de bijbehorende amplificatie op ongebruikelijke curves.
Herhaal de PCR-run. |

Opmerkingen en suggesties

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

Vroege amplificatie van de wildtypecontrole (WTC) (FAM-amplificatie) en geen of zwakke amplificatie van de mutantcontrole (MTC) (FAM-amplificatie)

- a) Kruiscontaminatie
- Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie en herhaal de PCR-run.
- b) Omkering van de reactiemengsels in de buisjes of voormengsels
- Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie en herhaal de PCR-run.
- c) Omkering van stripbuisjes en/of monster-ID's
- Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Herhaal de PCR-run.

Opmerkingen en suggesties

Regelmatig mislukte wildtypecontrole (WTC) door een hoge achtergrondamplificatie onder het geldigheidsdoel van de assay (C_T)

Fout in het Rotor-Gene Q MDx-instrument	Controleer de onderhoudslogboeken van het instrument. Verkeerde uitlijning van de lens kan bijvoorbeeld leiden tot een hogere achtergrond. Als uitlijning van de lens geen deel uitmaakt van uw onderhoudsplan, neemt u contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN voor meer informatie en potentiële handelingen.
---	--

Run mislukt door inconsistent fluorescentiesignaal in controles en/of monsters (in alle buisjes)

Fout in accessoires van het Rotor-Gene Q MDx-instrument	Controleer de onderhoudslogboeken van het instrument. Mogelijk is de rotor met 72 putjes defect.
---	---

Als een probleem niet te wijten valt aan een van de oorzaken in het gedeelte "Problemen oplossen" of als het niet lukt het probleem op te lossen met de voorgestelde acties, neemt u contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN voor advies.

Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN wordt elke partij van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit getest ten opzichte van vooraf vastgelegde specificaties om consistente productkwaliteit te garanderen.

De volledige kit is aan een kwaliteitscontrole op een Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument onderworpen. Deze kit is geproduceerd conform de norm ISO 13485. Op aanvraag zijn analysecertificaten verkrijgbaar via www.qiagen.com/support/.

Beperkingen

De kit is bestemd voor professioneel gebruik.

Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door personeel dat speciaal is opgeleid en getraind in het gebruik van moleculaire biologische technieken en bekend is met deze technologie.

De kit dient te worden gebruikt conform de instructies in deze handleiding, in combinatie met een gevalideerd instrument dat wordt genoemd in "Benodigde maar niet meegeleverde materialen", pagina 15.

Alle reagentia in de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit zijn uitsluitend bestemd voor gebruik met de andere reagentia in dezelfde kit. Dit kan invloed hebben op de prestaties.

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

De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit is uitsluitend gevalideerd voor volbloed ontstold met 2K EDTA.

De *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit is uitsluitend gevalideerd voor gebruik in combinatie met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236) of de DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104).

Alleen de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (voor PCR) en de QIASymphony SP (voor monsterbereiding) zijn gevalideerd.

Bij off-label gebruik van dit product en/of modificatie van de componenten vervalt de aansprakelijkheid van QIAGEN.

Diagnostische resultaten die worden gegenereerd, moeten worden geïnterpreteerd in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen. Als de *CALR*-status van een monster "No Mutation Detected" (Geen mutatie gedetecteerd) is, betekent dit enkel dat binnen de limieten van de sensitiviteit van de kit geen van de 36 mutaties is gevonden die in deze handleiding worden beschreven (zie Tabel 1) of dat mutaties van type 23 en type 27 niet zijn gedetecteerd (zie "Kwaliteitskenmerken/Specificiteit" op pagina 72). Dit sluit de aanwezigheid van andere *CALR*-mutaties niet uit.

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

Kwaliteitskenmerken

Blancolimiet

De blancolimiet (LOB) is vastgesteld conform de CLSI/NCCLS EP-17-A2-norm (8) voor gezonde volbloedmonsters, met een wildtype-CALR-status (5 monsters, 60 metingen per partij reagentia, 2 *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit-partijen gebruikt). De LOB is voor elke assay vastgesteld als de laagste verkregen LOB-waarde.

De LOB-resultaten zijn samengevat in tabel 5.

Tabel 5. Overzicht van de blancolimietresultaten voor de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit

CALR-assay	Blancolimiet (C_T-FAM-waarden)
TYPE 1	35,24
TYPE 2	45,00
CLAMP 1	40,01
CLAMP 2	45,00
CLAMP 3	45,00
CLAMP 4	45,00
CLAMP 5	38,90

Detectielimiet

De detectielimiet (LOD) is vastgesteld conform de "Probit approach" (Probit-aanpak) die wordt beschreven in de norm CLSI/NCCLS EP-17-A2 (8). In dit onderzoek zijn 5 lage niveaus van mutatie geanalyseerd voor 3 onafhankelijke monsters (gDNA geëxtraheerd van een CALR-mutatiepositieve patiënt vermengd met wildtype-DNA). In totaal zijn met 2 partijen *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit 20 replicaten per verdunning per positief monster uitgevoerd voor de TYPE 1- en TYPE 2-assays.

De LOD voor een bepaalde assay is vastgesteld als de hoogste LOD-waarde die is verkregen in twee beschouwde partijen. De resultaten duiden erop dat de analytische sensitiviteit voor de *CALR*-mutatie van type 1 0,60% is en dat de analytische sensitiviteit voor de *CALR*-mutatie van type 2 0,08% is (tabel 6).

Tabel 6. Overzicht van de detectielimietresultaten voor de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit

CALR-assay	Detectielimiet
TYPE 1	0,60%
TYPE 2	0,08%

DNA-input

De optimale gDNA-input om te gebruiken in combinatie met de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit, is voor 5 verschillende gDNA-inputs met één kitpartij geëvalueerd voor 3 *CALR*-positieve monsters (plasmiden vermengd met wildtype-gDNA) en één *CALR*-negatief monster. In dit onderzoek zijn 3 replicaten uitgevoerd per ingevoerd monster en per *CALR*-assay. De resultaten lieten zien dat de optimale input 50 ng (10 ng/μl) is.

Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

Het precisieonderzoek is uitgevoerd conform de norm CLSI/NCCLS EP5-A2 (9). Voor elke *CALR*-assay werd de precisie beoordeeld voor een bepaalde *CALR*-mutatie, bijvoorbeeld type 1 voor de TYPE 1-, CLAMP 1- en CLAMP 2-assays, type 2 voor de TYPE 2- en CLAMP 5-assays en type 28 voor de CLAMP 3- en CLAMP 4-assays. Er zijn testen uitgevoerd op 3 niveaus van mutatie: 5%, 25% en 50% (plasmiden vermengd met wildtype-gDNA). Elk niveau is dubbel getest op 49 runs die in een periode van 20 dagen zijn verwerkt, met minimaal 73 metingen per niveau van mutatie en per assay. De 3 monsters lieten voor de meeste assays een variatiecoëfficiënt voor de totale precisie (CV_{Totaal}) kleiner dan 5% (tabel 7) zien.

Opmerking: Voor de CLAMP-assays kan de totale precisie variëren per *CALR*-mutant.

Tabel 7. Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit

CALR- assay	Niveau van mutatie	Aantal metingen	Sr*	Srr†	Totaal‡	CV _{Totaal} §
TYPE 1	50%	88	0,10	0,07	0,21	0,80
	25%	88	0,10	0,07	0,20	0,76
	5%	88	0,15	0,05	0,30	1,04
TYPE 2	50%	80	0,11	0,08	0,21	0,85
	25%	80	0,11	0,00	0,19	0,73
	5%	80	0,12	0,08	0,27	0,95
CLAMP 1	50%	106	0,14	0,13	0,27	1,05
	25%	105	0,13	0,28	0,50	1,90
	5%	106	0,20	0,37	0,55	1,92
CLAMP 2	50%	84	0,13	0,31	0,59	2,24
	25%	85	0,19	0,36	0,90	3,28
	5%	82	0,37	0,59	1,27	4,16
CLAMP 3	50%	84	0,49	0,52	2,33	8,04
	25%	84	0,73	0,70	3,54	11,26
	5%	84	1,28	3,18	5,70	15,03
CLAMP 4	50%	73	0,22	0,33	1,32	4,46
	25%	76	0,24	0,33	1,37	4,46
	5%	73	0,26	0,37	1,59	4,66
CLAMP 5	50%	100	0,17	0,17	0,66	2,52
	25%	100	0,21	0,05	0,75	2,73
	5%	104	0,39	0,55	0,94	3,04

* Sr: herhaalbaarheid uitgedrukt als standaarddeviatie.

† Srr: reproduceerbaarheid tussen runs uitgedrukt als standaarddeviatie.

‡ Totale precisie (met verschillende instrumenten, operators en partijen; uitgedrukt als standaarddeviatie).

§ Variatiecoëfficiënt voor de totale precisie.

Stoffen met een versturende werking

De opzet van het onderzoek was gebaseerd op aanbevelingen die worden beschreven in de NCCLS-norm EP07-A2 (10). In totaal werden 17 stoffen die potentieel aanwezig zijn in bloedmonsters uitgekozen vanwege hun potentiële effect op de PCR (busulfan, citalopram-hydrobromide, paroxetine-hydrochloridehemihydraat, sertraline-hydrochloride, fluoxetine-hydrochloride, acetaminophen [paracetamol], ongeconjugeerde bilirubine, kalium-EDTA, hemoglobine [humaan], triglyceride, lisinoprioldihydraat, hydroxyurea, acetylsalicylzuur, salicylzuur, thiotepa, anagrelide, interferon alfa-2b). Ook werd het potentiële effect beoordeeld van één stof die werd gebruikt tijdens het gDNA-extractieproces (proteïnase K).

De resultaten lieten zien dat geen van deze stoffen een versturende werking had.

Specificiteit

De specificiteit van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit is geëvalueerd door te testen hoe goed de kit mutaties van type 1 en type 2 identificeert en hoe goed de kit de mutaties beschreven in Tabel 1 detecteert.

Voor de mutaties van type 1 en type 2 werd het onderzoek uitgevoerd op gDNA-monsters die waren geëxtraheerd uit volbloed van patiënten met MPN Ph-. De concentraties waren $\geq 16\%$ mutatie voor type 1 en $\geq 9\%$ mutatie voor type 2. De specificiteit voor type 1 en type 2 werd bevestigd: alle monsters werden gedetecteerd en correct geïdentificeerd.

De specificiteit voor mutaties van type 3 tot en met type 36 werd getest op gDNA-monsters die waren geëxtraheerd uit volbloed van patiënten met MPN Ph-, voor zover beschikbaar (dat wil zeggen voor de typen 3, 4, 5, 24, 25, 27 en 29). Voor elke zeldzame mutatie waarbij geen patiëntmonster beschikbaar was, werd de specificiteit beoordeeld met synthetisch materiaal, bestaande uit humaan wildtype-gDNA vermengd met plasmide-DNA met een bekende CALR-mutatie, bij klinisch relevante concentraties $> 10\%$ mutatie (gemiddelde concentratie is circa 30% mutatie).

De resultaten lieten zien dat alle *CALR*-mutaties van type 3 tot en met type 10, welke het vaakst worden waargenomen, door ten minste één assay van *ipsogen CALR RGQ PCR Kit* worden gedetecteerd. De meeste *CALR*-mutaties van type 11 tot en met 36 (aanwezigheid van 0,3%) worden door ten minste één assay van de *ipsogen CALR RGQ PCR Kit* gedetecteerd. Alleen de typen 23 en 27 worden niet gedetecteerd door de kit, terwijl de typen 22, 25, 26, 29 en 30 mogelijk alleen worden gedetecteerd in monsters met een hoge *CALR*-allelast.

Belangrijke opmerking: Het specificiteitsonderzoek liet zien dat mutaties van type 5 en type 17 worden gedetecteerd met de TYPE 1-assay. De TYPE 2-assay maakt amplificatie mogelijk van mutaties van type 10, type 31 en type 33–36. Dit was wat verwacht werd op basis van de grote overeenkomsten tussen de sequenties van deze typen *CALR*-mutaties (zie Tabel 1), met uitzondering van de mutatie van type 17. Daarom kan de *ipsogen CALR RGQ PCR Kit* geen onderscheid maken tussen mutaties van type 1 en type 5/17, en ook niet tussen mutaties van type 2 en type 10/31/33–36. Er bestaat qua diagnose of behandeling momenteel geen noodzaak om elke *CALR*-mutatie te kunnen onderscheiden; de meeste *CALR*-mutaties leiden tot de generatie van vergelijkbare mutante *CALR*-proteïnen.

Klinische validatie en vergelijking van methoden

Het doel van dit onderzoek was om de *ipsogen CALR RGQ PCR Kit* te valideren bij normale gebruiksomstandigheden. Aan de hand van het onderzoek kon worden vastgesteld hoe goed de kit *CALR*-mutaties van type 1 en type 2 kan identificeren in een cohort dat bestaat uit patiënten met verdenking van MPN. Dit validatieonderzoek is uitgevoerd op gDNA-monsters geëxtraheerd uit 227 patiënten met verdenking van MPN (waaronder *CALR*-positieve en *CALR*-negatieve monsters).

De *CALR*-status van de gDNA-monsters verkregen met de *ipsogen CALR RGQ PCR Kit* werd vergeleken met de *CALR*-status verkregen met een onafhankelijke mutatiedetectiemethode op basis van fragmentgrootteanalyse in combinatie met bidirectionele Sanger-sequencing. In het

geval van strijdige resultaten werd een derde mutatiedetectiemethode ingezet, namelijk nieuwe generatie sequencing (NGS).

In tabel 8 vindt u de *CALR*-status van alle monsters die in dit onderzoek zijn gebruikt, zoals vastgesteld met de referentiemethoden. Het cohort omvat 54,6% positieve monsters en 45,4% negatieve monsters. Van de positieve monsters werd met de referentiemethoden 42,7% geïdentificeerd als type 1 en 33,1% als type 2. Deze percentages zijn consistent met de waarden die Klampfl et al. beschrijven (5), dat wil zeggen 53% voor type 1 en 31,7% voor type 2 (zie Tabel 1).

Tabel 8. *CALR*-mutatiestatus van het gehele cohort, zoals vastgesteld met de volgende referentiemethoden: fragmentgrootteanalyse, bidirectionele Sanger-sequencing en NGS-analyse

CALR-status	Nummer
Mutatie van type 1	53
Mutatie van type 2	41
Type 1 en type 2	1
Andere <i>CALR</i> -mutaties	29
<i>CALR</i> -mutatie positief	124 (54,6%)
<i>CALR</i> -mutatie negatief	103 (45,4%)
Totaal aantal monsters	227

Alle monsters in het cohort die zijn geïdentificeerd met een *CALR*-mutatiestatus van type 1 en/of type 2, werden correct geïdentificeerd met de *ipsogen* *CALR* RGQ PCR Kit. Aan twee monsters werd door de *ipsogen* *CALR* RGQ PCR Kit onterecht een mutatie van type 1 toegeschreven: één monster dat door de referentiemethoden werd geïdentificeerd als een mutatie van type 5 en één monster dat werd geïdentificeerd als mutatie die niet wordt beschreven door Klampfl et al. (5). Verder werd aan één monster onterecht een mutatie van type 2 toegeschreven; dit monster werd door de referentiemethoden geïdentificeerd als mutatie die niet wordt beschreven door Klampfl et al. (5). In-silicoanalyse liet zien dat deze

strijdige monsters waarschijnlijk het gevolg zijn van de grote overeenkomsten tussen de sequenties van deze mutaties en de sequenties van de mutaties van type 1 en type 2.

De algehele concordantie tussen de met de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit verkregen gecombineerde resultaten voor mutaties van type 1 en type 2 en de resultaten van fragment-grootteanalyse/Sanger-sequencing/NGS-analyse is 98,7% (betrouwbaarheidsinterval [96,2%; 99,5%]). De sensitiviteit en specificiteit van de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit voor CALR-mutaties van type 1 en type 2 gecombineerd zijn 100% (betrouwbaarheidsinterval [96,2%; 100%]) en 97,7% [93,5%; 99,5%]) (tabel 9).

Tabel 9. Samenvatting van de prestatieresultaten voor CALR-mutaties van type 1 en type 2 gecombineerd

Variabele	Schatting	95% betrouwbaarheidsinterval
Algehele concordantie	98,7%	[96,2%; 99,7%]
Sensitiviteit	100%	[96,2%; 100%]
Specificiteit	97,7%	[93,5%; 99,5%]

Referenties

1. James, C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
2. Levine, R.L., et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
3. Kralovics, R., et al. (2005) A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
4. Baxter, E.J., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
5. Klampfl, T., et al. (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2379.
6. Nangalia, J., et al. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2391.
7. Arber, D.A., et al. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP5-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). *Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP07-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symbolen

De volgende symbolen kunnen worden weergegeven op de verpakking en etiketten:

Symbol

Definitie van symbolen

REF

Catalogusnummer



Fabrikant

MAT

Materiaalnummer

Rn

'R' staat voor de revisie van de handleiding en 'n' is het revisienummer

LOT

Partijnummer

GTIN

Global Trade Item Number

Symbol**Definitie van symbolen**

Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek



CE-markering voor Europese regelgeving



Uiterste gebruiksdatum



<N>

Bevat voldoende reagentia voor N reacties



Temperatuurbepering



Raadpleeg Instructies voor gebruik



Weghouden van zonlicht

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit (24)	Voor 24 reacties: CALR-wildtypecontrole, CALR-mutantcontrole, CALR-reactiemengsel TYPE 1, CALR-reactiemengsel TYPE 2, CALR-reactiemengsel CLAMP 1, CALR-reactiemengsel CLAMP 2, CALR-reactiemengsel CLAMP 3, CALR-reactiemengsel CLAMP 4, CALR-reactiemengsel CLAMP 5, Taq DNA-polymerase, TE-buffer voor verdunning en NTC	674023
Rotor-Gene Q MDx en accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler en smeltanalyse met hoge resolutie (HRM) met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software en accessoires, inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en werk; installatie en opleiding niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler en smeltanalyse met hoge resolutie (HRM) met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software en accessoires, inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en werk, installatie en opleiding	9002033
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium blok voor het handmatig instellen van reactiemengsel met een eenkanaalspipet in 72 buisjes van 0,1 ml	9018901

Product	Inhoud	Cat.nr.
72-Well Rotor	Voor het vasthouden van stripbuisjes van 0,1 ml met dop; vereist vergrendelingsring voor rotor met 72 putjes	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Voor het vergrendelen van stripbuisjes van 0,1 ml met dop in de rotor met 72 putjes	9018904
Rotor Holder	Losse metalen houder voor het verzamelen van buisjes en Rotor-Discs® in een rotor	9018908
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips van 4 buisjes met doppen voor 1000 reacties	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 × 250 strips van 4 buisjes met doppen voor 10.000 reacties	981106
QIASymphony SP en accessoires		
QIASymphony SP System	QIASymphony-module voor monsterbereiding: bevat installatie en opleiding, 1 jaar garantie op onderdelen en werk	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony-module voor monsterbereiding: bevat 1 jaar garantie op onderdelen en werk	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Monsterbereidingscartridges met 8 putjes voor gebruik in combinatie met de QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Afdekkingen voor 8 staafjes voor gebruik in combinatie met de QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Wegwerpfiltertips, in een rek; (8 × 128). Voor gebruik in combinatie met de QIAcube®- en QIASymphony SP/AS-instrumenten	990332

Product	Inhoud	Cat.nr.
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Wegwerpfiltertips, in een rek; (8 × 128). Voor gebruik in combinatie met de QIASymphony SP/AS-instrumenten	997024
Tube Insert 3b, 2 ml, v2, sample carrier, Qsym	Adapter voor secundaire buisjes (voor buisjes van 2 ml met schroefdop) voor gebruik met de QIASymphony-buisjeshouder	9242083
Elution Microtubes CL (24 × 96)	Niet-steriele buisjes van polypropyleen (0,85 ml maximumcapaciteit, minder dan 0,7 ml opslagcapaciteit, 0,4 ml elutiecapaciteit); 2304 in rekken van 96; inclusief doppenstrips	19588
Verwante producten		
QIAamp DNA DSP Blood Mini Kit (50)	Voor 50 bereidingen: QIAamp Mini-draaikolommen, buffers, reagentia, buisjes, VacConnectors	61104
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Voor 192 bereidingen van elk 200 µl: Bevat 2 reagenscartridges en enzymrekken en accessoires.	937236
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 eenheden/ml, oplossing)	19101

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de betreffende QIAGEN-kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke leverancier.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten.

Dit product is bestemd voor in vitro diagnostisch gebruik. Zonder schriftelijke toestemming van QIAGEN mogen QIAGEN-producten niet worden doorverkocht, gemodificeerd voor doorverkoop of gebruikt voor de productie van commerciële producten.

De in dit document gegeven informatie kan zonder kennisgeving worden gewijzigd. QIAGEN aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten in dit document. Dit document is voor zover bekend volledig en accuraat op het moment van publicatie. In geen geval is QIAGEN aansprakelijk voor incidentele schade, speciale schade, meervoudige schade of gevolgschade in verband met, of voortvloeiend uit, het gebruik van dit document.

Voor QIAGEN-producten geldt een garantie voor de vermelde specificaties. De enige verplichting van QIAGEN en het enige recht van herstel van de klant zijn beperkt tot gratis vervanging van de producten in het geval dat de producten niet functioneren zoals is gegarandeerd.

CALR-mutatie en het gebruik daarvan zijn beschermd door patentrechten, waaronder het Europese patent EP2808338 en buitenlandse tegenhangers. De aankoop van dit product betekent niet dat u daarmee het recht verwerft het te gebruiken voor klinische trials voor CALR-medicijnen. QIAGEN ontwikkelt specifieke licentieprogramma's voor dergelijk gebruik. Neem contact op met QIAGEN Corporate Business Development via bd@qiagen.com.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony®, *ipsogen*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Groep); BHQ®, Black Hole Quencher® (LGC Biosearch); FAM™, HEX™, SYBR® (Life Technologies, Inc.); GenBank® (National Center for Biotechnology Information); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co.).

Beperkte licentieovereenkomst voor de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit

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

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met deze gebruiksaanwijzing (gebruikershandleiding) en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich in de kit bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van deze kit te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij de kit zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in deze gebruiksaanwijzing (handleiding) en in aanvullende protocollen die verkrijgbaar zijn op www.qiagen.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie www.qiagen.com voor bijgewerkte licentievoorwaarden.

HB-2198-002 1103549 157025473 04-2017

© 2016-2017 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

