

April 2017

Håndbog til *ipsogen*[®] CALR RGQ PCR-kittet



24

Version 1



Til in vitro-diagnostisk brug

Til brug med Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-instrumentet



674023



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



R2

1103549DA

Indhold

Tilsigtet anvendelse	4
Oversigt og forklaring	4
Funktionsprincip	9
Medfølgende materialer	14
Kit-indhold	14
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	15
Advarsler og forholdsregler	17
Forholdsregler	18
Opbevaring og håndtering af reagenser	20
Håndtering og opbevaring af prøver	21
Helblod	21
Genomisk DNA-prøver	21
Procedure	22
Genomisk DNA-ekstrahering og klargøring	22
Manuel gDNA-ekstraktion med QIAamp DSP DNA Blood Mini-kittet	22
Automatiseret gDNA-ekstraktion med QIAsymphony DSP DNA Mini-kittet	26
Kvantificering og bestemmelse af DNA-renhed	31
Normalisering af genomisk DNA-prøve	31
Protokol: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument	32
Installation af Gamma-Plug-in og import af analyseprofilen	32
Konfiguration af isætningsblok og rotor	34
Oprettelse af en arbejdsliste	37

Konfiguration af qPCR	38
Klargøring af Rotor-Gene MDx og start af qPCR-kørslen	40
Frigiv og rapporter qPCR-resultater	41
Fortolkning af resultater	43
Dataanalyse	43
Gentest	44
Visning af resultater	46
Fejlfindingsvejledning	54
Kvalitetskontrol	63
Begrænsninger	63
Ydelseskarakteristik	65
Tomgrænse	65
Påvisningsgrænse	65
DNA-input	66
Repeterbarhed og reproducerbarhed	66
Interfererende stoffer	68
Specificitet	68
Klinisk validering og metodesammenligning	69
Litteraturhenvisninger	72
Symboler	73
Bestillingsinformation	75

Tilsigtet anvendelse

ipsogen CALR RGQ PCR-kittet er en PCR-in vitro-test i realtid til påvisning af *CALR*-mutationer i genomisk DNA fra helblodsprøver fra forsøgspersoner, der mistænkes at have myeloproliferative neoplasmer (MPN). *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet giver også mulighed for identifikation af de to primære *CALR* mutationer (type 1 og type 2) og er beregnet til brug med QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-plattformen. Produktet er beregnet til brug af professionelle brugere, såsom laboratorieteknikere og læger, der er uddannet i molekylærbiologisk teknik.

Der skal udvises passende omhu og årvågenhed ved håndteringen af produkterne.

Vi anbefaler, at alle brugere af QIAGENS produkter overholder NIH-retningslinjerne (National Institutes of Health), der er udviklet til eksperimenter med rekombinant DNA, eller andre gældende retningslinjer.

Oversigt og forklaring

Myeloproliferative neoplasmer er en gruppe af sygdomme, som repræsenterer 39% af de maligne hæmatologiske sygdomme, karakteriseret ved kronisk ophobning af forskellige typer modne blodlegemer i blodet, som er enten Philadelphia-kromosompositive (Ph+) eller -negative (Ph-).

En tilbagevendende somatisk mutation, V617F, der påvirker Janus-tyrosinkinase 2-genet (*JAK2*), blev identificeret i 2005 (1-4) og førte til et afgørende gennembrud i forståelsen, klassificeringen og diagnosticeringen af MPN. Blandt det samlede antal patienter med MPN Ph-, the *JAK2* V617F påvistes mutation hos >95% af patienter med polycythemia vera (PV), 50-60% af patienter med idiopatisk trombocytopeni (ET) og hos 50% af patienter med primær myelofibrose (PMF). Derudover havde 5-10% af ET- og PMF-forsøgspersonerne aktiverende mutationer i trombopoietinreceptorgenet (*MPL*). Ingen specifik molekylær markør blev identificeret hos de resterende 30 til 45% af patienterne.

Opdagelsen af somatisk erhvervede mutationer i *CALR*-genet (kodende for calreticulinproteinet) hos en betydelig del af patienter med MPN Ph⁻ har givet en ny markør af klonal sygdom (5, 6), der fremmer både diagnose og prognose i disse tidligere molekylært ukarakteriserede tilfælde. Somatiske insertioner eller deletioner i *CALR* exon 9 blev fundet hos et flertal af patienter med MPN Ph⁻ uden *JAK2*-mutation. I alt 36 "typer" (Table 1), insertioner, deletioner, substitutioner eller en kombination af disse, blev oprindeligt identificeret for *CALR*. De fleste af dem førte til et frameshift med samme alternative læsningsramme, der forårsager dannelse af mutante *CALR*-proteiner med den samme nye aminosyresekvens ved C-terminalen. Dette frameshift blev foreslået at ændre den cellulære lokalisering af forskellige mutante proteiner og påvirke Ca²⁺-bindingsfunktionen for deres C-terminaldomæner.

Den nøjagtige patologiske mekanisme er endnu ikke blevet fuldstændig belyst, men in vitro undersøgelser har vist, at overekspression af den hyppigste *CALR*-deletion (type 1-mutation, se tabel 1) forårsagede cytokin-uafhængig cellevækst (5).

Tabel 1. Liste over *CALR*-mutationer fra type 1 til type 36

Type	COSMIC-id*	Hyppighed (%)†	Mutant <i>CALR</i> cDNA-notation
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
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]

Type	COSMIC-id*	Hyppighed (%)†	Mutant CALR cDNA-notation
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_1145delinsCGTTTA
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
33	COSM1738355	0,3	c.1154_1155insATGTC
34	COSM1738331	0,3	c.1154_delinsCTTGTC

Type	COSMIC-id*	Hyppighed (%)†	Mutant <i>CALR</i> cDNA-notation
35	COSM1738356	0,3	c.1154delinsTTTGTC
36	COSM1738332	0,3	c.1155_1156insTGTCG

* ID'er fra COSMIC v72 (cancer.sanger.ac.uk/cosmic/).

† Frekvenser fra et al (2013) (5).

‡ NI: Mutationshændelse ikke identificeret i COSMIC.

Traditionelt var diagnosen af MPN'er baseret på kliniske, knoglemarvshistologiske og cytogenetiske kriterier. Opdagelsen af en sygdomsspecifik molekylær markør resulterede i både en forenkling af processen og øget diagnostisk nøjagtighed. Forståelse af det molekylære grundlag for ET og PMF hos patienter uden *JAK2*- og *MPL*-mutationer har været en hovedmålsætning inden for MPN-forskningsområdet. På denne måde giver opdagelsen af *CALR*-mutationer en yderligere molekylær markør i forbindelse med både diagnose og prognose for patienter med MPN Ph-. Påvisning af *CALR*-mutation udgør nu en del af WHO's (World Health Organization) 2016-kriterier for diagnosticering af MPN (tabel 2), og tilstedeværelsen af denne mutation er et vigtigt kriterium ved diagnostisk bekræftelse.

Tabel 2. WHO's kriterier for diagnosticering af MPN (tilpasset fra reference 7)

WHO's kriterier for diagnosticering af idiopatisk trombocytopeni

Primære kriterier:

1. Trombocytal $\geq 450 \times 10^9/l$.
2. Knoglemarvsbiopsi viser spredning af hovedsageligt megakaryocytlinjen med forøget antal forstørrede, modne megakaryocytter med hyperlobulerede kerner. Ingen markant stigning eller venstre-skift i neutrofil granulopoiese eller erythropoiese og meget sjældent mindre stigning i reticulinfibre.
3. Opfylder ikke kriterierne for *BCR-ABL1* + CML*, PV, PMF, myelodysplastiske syndromer (MDS) eller andre myeloid-neoplasmer.
4. Tilstedeværelsen af *JAK2*-, *CALR*- eller *MPL*-mutation.

Sekundært kriterium:

Tilstedeværelsen af en klonal markør eller manglende evidens for reaktiv trombocytose

WHO's kriterier for diagnosticering af primær myelofibrose

Primære kriterier:

1. Tilstedeværelse af megakaryocytproliferation og atypi, ledsaget af enten reticulin- og/eller kollagenfibrose.
2. Opfylder ikke kriterierne for ET, PV, *BCR-ABL1* + CML, MDS eller andre myeloid-neoplasmer.
3. Tilstedeværelse af *JAK2*-, *CALR*- eller *MPL*-mutation eller fravær af disse mutationer, tilstedeværelse af en anden klonal markør eller fravær af reaktiv myelofibrose.

Sekundære kriterier:

Tilstedeværelsen af mindst ét af følgende, bekræftet i to på hinanden følgende bestemmelser:

- a) Anæmi, der ikke kan tilskrives en konkomiterende sygdom
- b) Leukocytose $\geq 11 \times 10^9/l$
- c) Palpabel miltsvulst
- d) LDH* steget til over øvre normal grænse for institutionens referenceområde
- e) Leukoerythroblastosis

WHO's kriterier for polycythemia vera

Primære kriterier:

1. Hæmoglobin (Hgb) >16,5 g/dl hos mænd, Hgb >16,0 g/dl hos kvinder; eller hæmatokrit (Hct) >49% hos mænd, Hct >48% hos kvinder; eller, forøget erytrocytmasse.
2. Knoglemarvsbiopsi viser hypercellularitet for alder med trilineær vækst (panmyelose) herunder fremtrædende erythroid, granulocytisk og megakaryocytisk spredning med pleomorfe, modne megakaryocytter (forskellig størrelse).
3. Tilstedeværelsen af *JAK2* V617F-eller *JAK2* exon 12-mutation

Sekundært kriterium:

Subnormal serumkoncentration af erythropoietin

* CML: kronisk myeloid leukæmi; LDH: laktat-dehydrogenase.

Påvisning af *CALR*-mutationer i gDNA udvundet fra perifere blodceller bruges nu som et diagnostisk værktøj på samme måde som påvisning af JAK2-mutationer, hvilket har forenklet og forbedret nøjagtigheden af diagnosticering af patienter med MPN. *CALR*- og JAK2-testene (*ipsogen CALR RGQ PCR-kittet* og *ipsogen JAK2 RGQ PCR-kittet*) er blevet valideret med samme gDNA-udvindingsmetoder, og således kan den samme prøve testes med to forskellige qPCR-kit.

Funktionsprincip

ipsogen CALR RGQ PCR-kittet er en PCR-realtidstest. Sættet anvender kvantitative teknikker med realtids-PCR (qPCR) til kvalitativ påvisning af somatiske mutationer i regionen c.1091_1162 (cDNA-annotation) af exon 9 i *CALR*-genet (GenBank® Accession Number CR457070) (5, 6) og muliggør også identifikation af de to primære *CALR*-mutationer (type 1 og type 2).

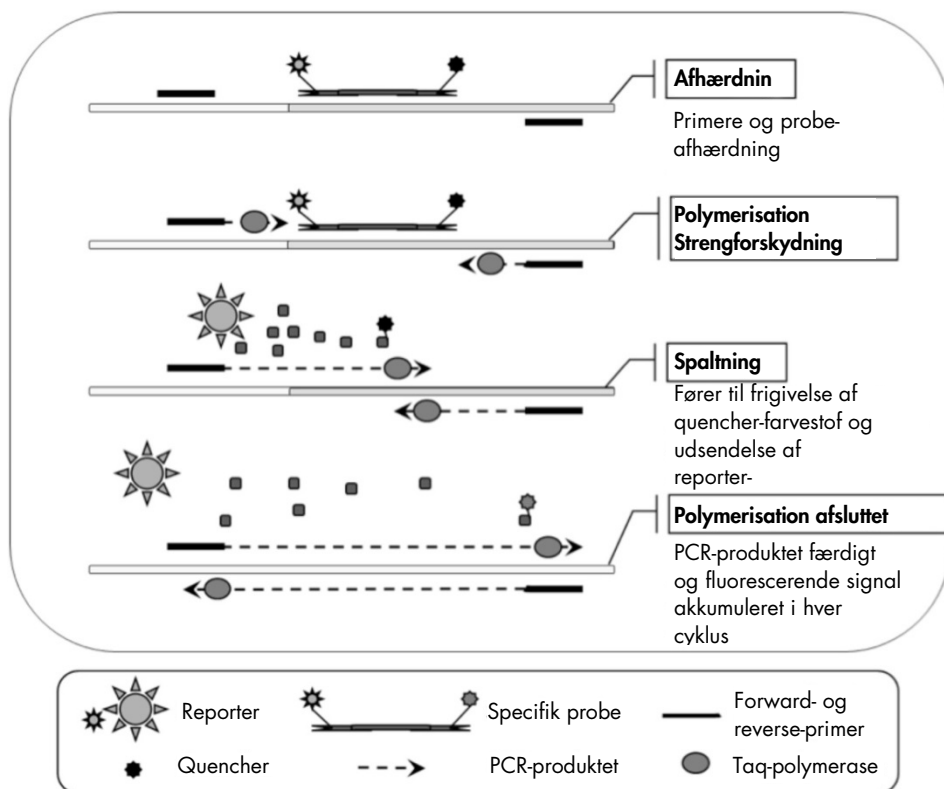
Sættet indeholder reagenser til at udføre syv separate PCR-amplifikationer i samme kørsel til identifikation af *CALR*-mutationer type 1 og type 2 og påvisning af yderligere sekundære varianter (anført under "Ydelseskarakteristik/Specificitet", side 68) i genomisk DNA udvundet fra humant perifert helblod. Gennemløbstiden for at udføre alle opgaver, fra gDNA ekstraktion (ved hjælp af manuel eller automatiseret ekstraktion) til dataanalyse, er mindre end én arbejdsdag.

Brugen af realtids-PCR muliggør den nøjagtige påvisning af en målrettet DNA-sekvens under den eksponentielle fase af amplifikationsprocessen. PCR-realtidsdata kan hurtigt indhentes, uden post-PCR-behandling, ved realtidspåvisning af fluorescerende signaler under PCR-cykling. I øjeblikket er tre hovedtyper af qPCR-teknikker til rådighed: qPCR-analyse ved anvendelse af SYBR® Green I-farvestof, qPCR-analyse ved anvendelse af hydrolyseprober og qPCR-analyse under anvendelse af hybridiseringsprober.

Denne analyse anvender qPCR-oligonukleotid-hydrolyse princippet. Under PCR hybridiserer forward- og reverse-primere til en bestemt sekvens. Et andet farvestofbundet oligonukleotid er indeholdt i samme blanding. Denne probe, som består af et oligonukleotid, der er mærket med et 5'-reporter-farvestof (F) og en 3'-farvefri nedstrøms-quencher (Q), hybridiserer til en målsekvens i PCR-produktet. Analyse med qPCR med hydrolyseprober udnytter 5'→3'-exonukleaseaktiviteten af *Thermus aquaticus* (Taq) DNA-polymerase. Når proben er intakt, resulterer reporter-farvestoffets nærhed til quencheren i undertrykkelse af reporter-fluorescensen, primært ved energioverførsel af Förster-typen.

Under PCR, og hvis intersemålet er til stede, afhænder og flankerer både forward- og reverse-primere specifikt den afhædede probe. 3'-enden af proben er blokeret for at forbygge forlængelse af proben under PCR (figur 1). Under polymeriseringsfasen kløver 5'→3'-exonukleaseaktiviteten af DNA-polymerase proben og resulterer i frigivelse af quencher-farvestof og udsendelse af reporter-fluorescenssignal. Probefragmenter bliver forskudt fra målet, og polymerisering af strengen fortsætter. Denne proces sker i hver cyklus og interfererer ikke med den eksponentielle akkumulering af produktet (se figur 1).

Stigningen i fluorescenssignalet detekteres kun, hvis målsekvensen er komplementær til primerne og proben og dermed amplificeres under PCR.

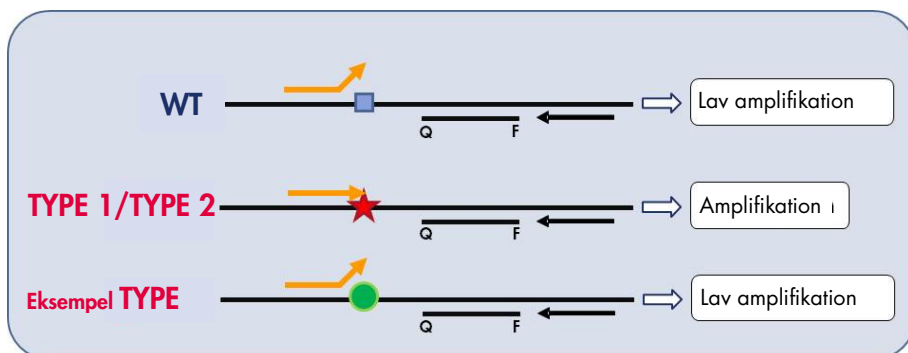


Figur 1. Princippet bag realtids-PCR-reaktioner.

Identifikation af de to primære *CALR*-mutationer

Med henblik på identifikation af *CALR*-mutationer af type 1 og type 2 opnås en allel-specifik amplificering med ARMS-teknologi (Allele Refractory Mutation System), der udnytter den specifikke hybridisering af primere til at skabe en komplementær sekvens og muligheden for, at DNA-polymerase kan skelne mellem et match og et ikke-match på 3'-enden af en PCR-primer.

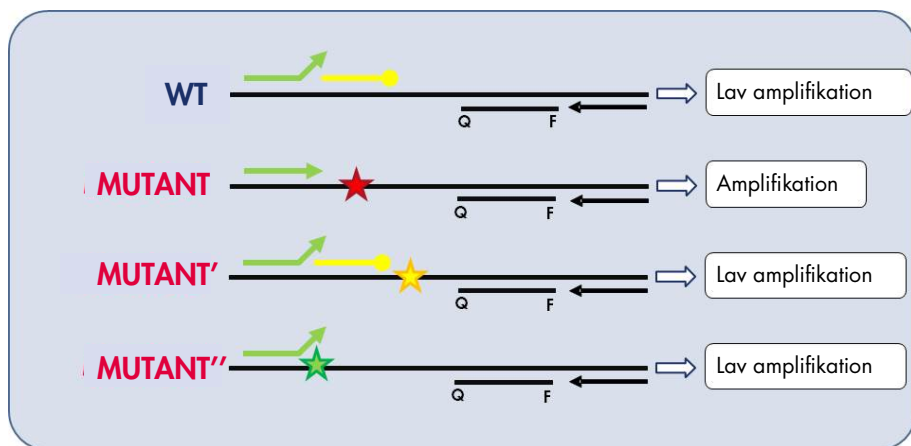
Når PCR-primere er fuldt matchet, fortsætter amplifikation med fuld effektivitet. Når 3'-basen ikke er matchet, forekommer der kun baggrundsamplifikation på et lavt niveau (figur 2).



Figur 2. Identifikation af type 1 og type 2 *CALR*-mutationer med ARMS PCR. WT: vildtype; Q – F: BHQ® – FAM™ dobbeltfarvningsprobe; ↗ forward-primer (orange) og reverse-primer (sort).

Påvisning af mindre varianter af *CALR*-mutationer

Til påvisning af mindre varianter af *CALR*-mutationer er primere og prober kombineret i reaktionsblandingerne med yderligere oligonukleotid, der er 3'-blokeret med tilføjelsen af en fosfatgruppe (et såkaldt CLAMP-oligonukleotid). CLAMP-oligonukleotidet er specifikt for en målrettet sekvens af vildtypen og hæmmer, ved afhærdning, forlængelse af PCR-produktet (PCR-clamping). Når PCR-skabelonen indeholder vildtypesekvensen, hybridiseres CLAMP før PCR-primere, og der sker ingen eller begrænset udvidelse af DNA-polymerasen. Når en muteret målsekvens er til stede, hybridiserer CLAMP ikke eller hybridiserer dårligt, PCR-primere binder, og amplifikation fortsætter (figur 3).



Figur 3. Påvisning af mindre *CALR*-mutationer. WT: vildtype; Q – F: BHQ – FAM dobbelt-farvningsprobe; $\rightleftarrows$ forward-primer (grøn) og reverse-primer (sort); —○: 3'-phosphat-oligonukleotid (CLAMP-oligonukleotid, gul).

Intern amplifikationskontrol (IAC) i alle reaktionsblandinger

For at validere og kontrollere qPCR-reaktionen ved tilstedeværelsen af skabelonen for humant genomisk DNA (gDNA) indeholder hver *CALR*-reaktionsblanding primere og prober til at detektere en endogen sekvens af humant *ABL1*-gen. Denne kontrolsekvens forstærkes i en PCR-multiplex-reaktion af alt *CALR*-mutant og vildtype-DNA og mærkes med hexachlorofluorescein (HEXTM) for at skelne det fra de fluoresceinamidit-mærkede (FAM) amplikoner i mutationsreaktionerne. For begge prober er quencheren Black Hole Quencher[®] (BHQ-1).

Medfølgende materialer

Kit-indhold

<i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit		(24)
Katalognummer		674023
Antal reaktioner		24
Farve	Identitet	Volumen
Gul	CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) Type 1	850 µl
Gul	CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) Type 2	850 µl
Lilla	CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) CLAMP 1	850 µl
Lilla	CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) CLAMP 2	850 µl
Lilla	CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) CLAMP 3	850 µl
Lilla	CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) CLAMP 4	850 µl
Lilla	CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) CLAMP 5	850 µl
Grønt	CALR Wild-Type Control (vildtype-kontrol)	145 µl
Rødt	CALR Mutant Control (mutantkontrol)	145 µl
Mintgrøn	Taq-DNA-polymerase	85 µl
Hvidt	TE Buffer	1,9 ml

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Sørg for, at instrumenterne regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.

- Dedikerede pipetter (justerbare) (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
Mindst to sæt pipetter anbefales, ét til fremstilling og distribution af PCR-reaktionsblandinger og ét til DNA-håndtering, herunder isætning af PCR-skabelon.
- Nukleasefrie, aerosol-resistente, sterile PCR-pipettespidser med hydrofobiske filtre
- 1,5 ml eller 2,0 ml nukleasefri PCR-rør
- Engangshandsker
- Vortex-mixer
- Spektrofotometer

Yderligere udstyr og materialer til manuel DNA-ekstrahering

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini-kit (katalognr. 61104)
- Ethanol (96–100%)
Bemærk: Der må ikke bruges denatureret alkohol, da dette indeholder andre stoffer som f.eks. metanol eller methylethylketon.
- Varmeblok til lysering af prøver ved 56 °C
- Bordcentrifuge med rotor til 0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml reaktionsrør (der kan nå op på 13.000-14.000 rpm.)

Yderligere udstyr og materialer til automatisk DNA-ekstrahering

- QIAasymphony® SP-instrument (katalognr. 9001297), softwareversion 4.0 eller højere, og forudsat tilbehør herunder Blood_200_V7_DSP-protokol
- Tube Insert 3b (rørindsats 3b) (katalognr. 9242083)
- QIAasymphony DSP DNA Mini-kit (kat.nr. 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (prøveklargøringsbeholdere, 8-brønds) (katalognr. 997002)
- 8-Rod Covers (8-stangstildækninger) (katalognr. 997004)
- Filter-Tips (Filterspidser), 1500 µl (katalognr. 997024)
- Filter-Tips (Filterspidser), 200 µl (katalognr. 990332)
- Elution Microtubes CL (Elueringsmikrorør CL) (katalognr. 19588)
- Tip disposal bags (spidsaffaldssække) (katalognr. 9013395)
- Microtubes (mikrorør) 2,0 ml Type H (Sarstedt, katalognr. 72.694)

Yderligere udstyr og materialer til PCR på Rotor-Gene Q MDx

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (katalognr. 9002032) og medfølgende tilbehør
- Rotor-Gene AssayManager®-softwareversion 2.1.x (hvor x = 0 eller højere)
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in-version 1.0.x (hvor x = 0 eller højere)
- CALR Assay Profile ipsogen_CALR_blood_CE-version 1.0.x (hvor x = 2 eller højere)
- Loading Block (isætningsblok) til 72 x 0,1-ml rør (katalognr. 9018901)
- 72-Well Rotor (72-brønds rotor) (katalognr. 9018903)
- Adaptor Locking Ring 72-Well Rotor (adapterlåsering til 72-brønds rotor) (katalognr. 9018904)
- Rotor Holder (Rotorholder) (katalognr. 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (striprør og hætter, 0,1 ml), til Rotor-Gene Q MDx (katalognr. 981103 eller 981106)
- Is (eller en køleblok)

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS) for yderligere information. De findes online i PDF-format på **www.qiagen.com/safety**, hvor sikkerhedsdatabladene for hvert QIAGEN-kit og hver kit-komponent kan læses og udskrives.

Sikkerhedsoplysninger vedrørende ekstraktionskittene QIAamp DSP DNA Blood Mini-kit (katalognr. 61104) og QIAasympphony DSP DNA Mini-kit (katalognr. 937236) kan findes i de respektive håndbøger. Der findes sikkerhedsinformationer om instrumenterne i brugervejledningen til de pågældende instrumenter.

ADVARSEL Risiko for personskade



Tilsæt IKKE blegemiddel eller sure opløsninger til væskeaffaldet fra prøveklargøringen.

Bufferne i reagensbeholderen fra QIAasympphony DSP DNA Mini-kittet indeholder guanidinsalte, der sammen med blegemiddel kan danne stærkt reaktive forbindelser. Hvis der spildes væske, der indeholder disse bufferne, rengøres med egnet rengøringsmiddel til laboratorier og vand. Hvis den spildte væske indeholder potentielt smittefarlige stoffer, rengøres det påvirkede område først med rengøringsmiddel til laboratorier og vand og dernæst med 1 % (v/v) natriumhypochlorit.

Forholdsregler

Brug af qPCR-test kræver god laboratoriepraksis, herunder sporbarhed, vedligeholdelse af udstyr til molekylærbiologi og overholdelse af gældende lovgivning og relevante standarder.

Dette kit er beregnet til in vitro-diagnostisk brug. Reagenser og vejledning, der medfølger i dette sæt, er testet for optimal ydeevne.

- Alle kemikalier og alt biologisk materiale er potentielt farligt. Prøver er potentielt farlige og skal håndteres som biologisk farlige materialer.
- Prøver og analyseaffald skal bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsprocedurer.
- Reagenserne til *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet er fortyndet optimalt. Fortynd ikke reagenserne yderligere, da dette kan resultere i tab af ydelse.
- Brug ikke reaktionsvolumener (reaktionsblanding plus prøve) på under 25 µl.
- Kvalitetskontrolprocedurer hos QIAGEN anvender test af funktionel kit-frigivelse for hvert individuelle kit-batch. Undlad derfor at blande reagenser fra forskellige batches, da dette kan påvirke ydeevnen.
- Kontroller, at applikationsproceffilerne og den nødvendige Rotor-Gene AssayManager v2.1-plugin er installeret.
- Se brugervejledningen til *Rotor-Gene Q MDx* og brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* for at se yderligere advarsler, forholdsregler og procedurer.
- Ændring af inkuberingstider og temperaturer kan resultere i forkerte eller afvigende data.
- Klargør alle reaktioner (reaktionsblandingen plus prøve) på is eller i en køleblok.
- Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.
- Reaktionsblandingerne kan ændres, hvis de udsættes for lys.
- Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre forurening af blandingerne med de materialer, der findes i kontrolreagenserne CALR Mutant Control og CALR Wild-Type Control.
- Udvis stor forsigtighed for at undgå DNA- eller PCR-produktkrydskontaminering, som kan resultere i et falsk positivt signal.

- Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre DNase-forurening, der kan resultere i forringelse af DNA-skabelonen.
- Brug individuelle, velegnede pipetter til konfigureringsblandinger og tilføjelse af skabeloner.
- Rotor-Gene Q MDx-instrumentet må ikke åbnes, før kørslen er afsluttet.
- Rotor-Gene Q MDx-rør må ikke åbnes, efter kørslen er afsluttet. Prøverør skal bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsprocedurer.
- Der skal udvises forsigtighed for at sikre korrekte test af prøver, hvad angår forkert prøveangivelse, fejl ved isætning og pipetteringsfejl.
- Kontroller, at prøverne håndteres på en systematisk måde for at sikre korrekt identifikation.

Vi anbefaler derfor følgende:

- Brug nukleasefrit laboratorieudstyr (f.eks. pipetter, pipettespidser, reaktionshætteglas), og brug handsker under udførelse af testen.
- Brug friske aerosol-resistente pipettespidser til alle pipetteringstrin for at undgå krydskontaminering af prøver og reagenser.
- Klargør præ-PCR-masterblanding med dedikerede materialer (pipetter, spidser osv.) i et til formålet særligt område, hvor ingen DNA-matricer (DNA, plasmid eller PCR-produkter) introduceres. Tilsæt, i det samme område, TE Buffer i NTC-rør, og luk dem. Stil prøver, der skal testes, reagenserne CALR Mutant Control (mutantkontrol) og CALR Wild-Type Control (vildtypekontrol) i separat rum med specifikt materiale (pipetter, spidser osv.).

Opbevaring og håndtering af reagenser

ipsogen CALR RGQ PCR-kittet forsendes på tøris. Hvis nogen af komponenterne i *tipsogen* CALR RGQ PCR-kittet ikke er frosne ved modtagelse, hvis den ydre emballage har været åbnet under transporten, eller hvis forsendelsen ikke indeholder en følgeseddel eller reagenserne, skal der rettes henvendelse til QIAGENs tekniske serviceafdeling eller lokale distributører (besøg www.qiagen.com).

ipsogen CALR RGQ PCR-kittet skal straks efter modtagelse opbevares ved -30 til -15 °C i en fryser med konstant-temperatur og beskyttes mod lys. Når det opbevares under de specifikke opbevaringsbetingelser, er *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet stabilt, indtil den anførte udløbsdato.

Når de er åbnet, kan reagenser opbevares i deres originale emballage ved -30 til -15 °C indtil udløbsdatoen, der er angivet på emballagen. Undgå gentagen optøning og indfrysning. Et reagens må højst nedfryses og optøs 5 gange.

Oplysninger vedrørende opbevaring og håndtering af ekstraktionskittene DSP QIAamp DNA Blood Mini-kit (katalognr. 61104) og QIASymphony DSP DNA Mini-kit (katalognr. 937236) kan findes i de respektive kithåndbøger.

Vær opmærksom på de udløbsdatoer og opbevaringsbetingelser, der er trykt på æsken og på etiketterne til samtlige komponenter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.

Håndtering og opbevaring af prøver

Helblod

ipsogen CALR RGQ PCR-kittet er beregnet til brug med genomiske DNA-prøver, som er ekstraheret fra helblodsprøver, der er antikoaguleret med 2K-EDTA. Helblod kan opbevares på følgende måde:

- Ved 2°C til 8°C i højst 96 timer
- Ved 15 °C til 25 °C i højst 96 timer
- Nedfrosset ved -30 °C til -15 °C i højst 1 måned

Genomisk DNA-prøver

Genomisk DNA kan opbevares ved 2 °C til 8°C i 1 uge efter ekstraktion eller ved -30 °C til -15 °C i højst 24 måneder efter ekstraktion, enten umiddelbart efter ekstraktion eller efter fortynding i TE-buffer.

Procedure

Genomisk DNA-ekstrahering og klargøring

ipsogen CALR RGQ PCR-kittet er blevet valideret i kombination med QIAamp DSP DNA Blood Mini-kittet (katalognr. 61104) til manuel ekstrahering eller QIAsymphony SP-instrumentet i kombination med QIAsymphony DSP DNA Mini-kittet (katalognr. 937236) til automatisk ekstrahering.

Kontroller at gDNA-ekstraktionsreagenserne ikke er udløbet og er blevet transporteret og oplagret under korrekte forhold.

Manuel gDNA-ekstraktion med QIAamp DSP DNA Blood Mini-kittet

Manuel gDNA-ekstraktion udføres med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (QIAamp DSP DNA Blood Mini-kittet) (katalognr. 61104) i henhold til håndbogen til *QIAamp DSP DNA Blood Mini-kittet* (*QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook*).

Ting, der skal gøres før start

- Lad blodprøver få stuetemperatur (15–25 °C), og sørg for, at de er homogeniserede.
- Forbered lysisbuffer

Hvis der har dannet sig en udfældning i lysisbuffer (AL), opløses det ved inkubering ved 56 °C.
- Forbered QIAGEN Protease

Tilsæt 1,2 ml Protease Solvent (PS) i hætteglasset med frysetørret QIAGEN Protease (QP) og bland det grundigt. For at undgå, at det skummer, blandes det ved at vende hætteglasset på hovedet adskillige gange. Det skal sikres, at QP er helt opløst.

Bemærk: Efter opløsning i PS er QP stabil i op til 2 måneder, når det opbevares ved 2–8 °C. For at forlænge levetiden af proteasen anbefales opbevaring ved -20 °C, men

gentagen nedfrysning og optøning bør undgås. Derfor anbefales det at opbevare afmålte portioner af QP.

- Forbered vaskebuffer 1

Vha. en målecylinder tilsættes 25 ml ethanol (96-100 %) til flasken med 19 ml vaskebuffer 1-koncentrat (AW1). Opbevar rekonstitueret AW1 ved stuetemperatur (15–25 °C).

Bemærk: Bland altid rekonstitueret AW1 ved at vende flasken på hovedet adskillige gange, før proceduren startes.

- Forbered vaskebuffer 2

Vha. en målecylinder tilsættes 30 ml ethanol (96-100 %) til flasken med 13 ml vaskebuffer 2-koncentrat (AW2). Opbevar rekonstitueret AW2 ved stuetemperatur (15–25 °C).

Bemærk: Bland altid rekonstitueret AW2 ved at vende flasken på hovedet adskillige gange, før proceduren startes.

- Forbered elueringsbuffer

En flaske elueringsbuffer (AE) er inkluderet i kittet. For at forhindre kontaminering af AE anbefaler vi på det kraftigste at anvende pipettespidser med aerosolskærme, når der pipetteres AE fra flasken og straks herefter at sætte hættten på flasken igen.

Lad Buffer AE få stuetemperatur (15–25 °C).

- Indstil en varmeblok til 56 °C til anvendelse i trin 4.

Procedure

1. Pipetter 20 µl protease QP i et lysisglas (LT).

Bemærk: Kontroller udløbsdatoen på det rekonstituerede protease før anvendelse.

2. Tilsæt 200 µl af blodprøven i lysisglasset.

3. Tilsæt 200 µl lysisbuffer (AL) i lysisglasset (LT), luk låget og ved hjælp af en impuls-vortexmixer i 15 sekunder, og centrifuger kortvarigt.

Bemærk: For at sikre effektiv lysering, er det væsentligt, at prøven og AL blandes grundigt for at give en homogen opløsning.

Bemærk: Eftersom Buffer AL har en høj viskositet, sørges der for, at det korrekte volumen AL tilsættes ved nøje pipettering og ved hjælp af en egnet pipette.

Vigtigt: Der må ikke tilsættes QP direkte til Buffer AL.

4. Inkuber ved 56 °C (± 1 °C) i 10 minutter (± 1 minut).
 5. Centrifuger lysisglas i cirka 5 sekunder ved fuld hastighed for at fjerne dråber fra den indvendige side af låget.
 6. Tilsæt 200 µl ethanol (96–100 %) til lysisglasset, luk låget og bland grundigt med impuls-vortexmixer i ≥ 15 sekunder.
 7. Centrifuger lysisglas i ≥ 5 sekunder ved fuld hastighed for at fjerne eventuelle væskedråber fra den indvendige side af låget.
 8. Tilsæt forsigtigt hele lysatet fra trin 7 til QIAamp Mini Spin Column uden at gøre kanten våd. Undgå at røre QIAamp Mini Spin Column-membranen med pipettespidsen.
- Bemærk:** Hvis adskillige prøver behandles, åbnes kun ét lysisglas ad gangen.
9. Luk for låget på QIAamp Mini Spin Column og centrifuger ved ca. 6.000 x g (8.000 rpm) i 1 minut.
 10. Anbring QIAamp Mini Spin Column i et rent vaskeglas (WT) og bortskaf glasset med filtratet.

Bemærk: Hvis lysatet ikke er passeret helt igennem membranen efter centrifugeringen ved ca. 6.000 x g (8.000 rpm), centrifugeres igen ved fuld hastighed (op til 20.800 x g) i 1 minut.

Bemærk: Hvis lysatet stadig ikke er passeret gennem membranen under centrifugeringen, bortskaffes prøven og isolation og oprensning gentages med nyt prøvemateriale.

11. Åbn forsigtig QIAamp Mini Spin Column og tilsæt 500 µl Buffer AW1 uden at gøre kanten våd. Undgå at røre QIAamp Mini Spin Column-membranen med pipettespidsen.

12. Luk for låget på QIAamp Mini Spin Column og centrifuger ved ca. 6.000 x *g* (8.000 rpm) i 1 minut.
13. Anbring QIAamp Mini Spin Column i et rent vaskeglas og bortskaf glasset med filtratet.
14. Åbn forsigtig QIAamp Mini Spin Column og tilsæt 500 µl Buffer AW2 uden at gøre kanten våd. Undgå at røre QIAamp Mini Spin Column-membranen med pipettespiden.
15. Luk for låget på QIAamp Mini Spin Column og centrifuger ved fuld hastighed (ca. 20.000 x *g* eller 14.000 rpm) i 1 minut.
16. Anbring QIAamp Mini Spin Column i et rent vaskeglas og bortskaf glasset med filtratet.
17. Centrifuger ved fuld hastighed (ca. 20.000 x *g* eller 14.000 rpm) i 3 minutter for at tørre membranen helt.
18. Anbring QIAamp Mini Spin Column i et rent elueringsglas (ET) og bortskaf vaskeglasset med filtratet.
19. Åbn låget på QIAamp Mini Spin Column forsigtigt og tilsæt 50 til 200 µl Buffer AE til midten af membranen.
Bemærk: Lavere elueringsvolumener øger den endelige DNA-koncentration i eluatet betydeligt, men reducerer det samlede DNA-udbytte en smule.
20. Luk låget og inkuber ved stuetemperatur (15–25 °C) i 1 minut.
21. Centrifuger ved ca. 6.000 x *g* (8.000 rpm) i 1 minut for at eluere DNA.
22. Opbevar gDNA-prøven under de rette forhold.
23. Kasser brugte prøverør, plader og affald i henhold til de lokale sikkerhedsbestemmelser.

Automatiseret gDNA-ekstraktion med QIAasymphony DSP DNA Mini-kittet

Automatiseret gDNA-ekstraktion udføres med QIAasymphony SP-instrumentet i kombination med QIAasymphony DSP DNA Mini-kittet (katalognr. 937236). Følg vejledningen i håndbogen til *QIAasymphony DSP DNA-kittet (QIAasymphony DSP DNA Kit Handbook)*. Vælg **Blood_200_V7_DSP**-protokollen på QIAasymphony.

Bemærk: Følgende funktioner i protokollen er specifikke for ekstrahering af gDNA fra helblod til analyse med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet:

- Overfør 300 µl helblod til et mikrorør (2,0-ml Type H, Sarstedt, katalognr. 72.694).
- Elueringsvolumen og outputposition er **100 µl** for helblodsprotokollen.

Vigtige anvisninger før start

- Det samlede volumen helblod, der skal udtrækkes, er 200 µl (plus 100 µl dødvolumen).
- Brugeren skal være bekendt med betjeningen af QIAasymphony SP. Se betjeningsvejledningen i de QIAasymphony SP-brugervejledninger, der leveres sammen med instrumentet.
- Vedligeholdelse (valgfrit) er ikke obligatorisk for instrumentets funktion, men det anbefales stærkt for at reducere risikoen for kontaminering.
- Før en reagensbeholder bruges første gang, skal det kontrolleres, at bufferne QSL1 og QSB1 ikke indeholder bundfald.

Fjern om nødvendigt de brønde, der indeholder bufferne QSL1 og QSB1, fra reagensbeholderen, og inkuber i 30 minutter ved 37 °C med jævnlig omrystning for at opløse præcipitatet. Sørg for at sætte brøndene ind på de rigtige pladser igen. Hvis reagensbeholderen allerede er gennembrudt, skal man sikre sig, at brøndene er forseglet med genbrugsforseglingstrips, derefter inkuberes hele reagensbeholderen (RC) i 30 minutter ved 37 °C med jævnlig omrystning i vandbad.

- Undgå for voldsom omrystning af reagensbeholderen (RC), ellers kan der dannes skum, hvilket kan medføre problemer med detektion af væskestanden.

Ting, der skal gøres før start

- Før proceduren startes, skal man sikre sig, at de magnetiske partikler er fuldt resuspenderede.
Hvirvl brønden med de magnetiske partikler kraftigt i mindst 3 minutter første gang før brug.
- Sørg for, at gennembrydningslåget placeres på reagensbeholderen, og at låget til magnetpartikelbrønden er fjernet, eller – hvis der benyttes en delvist brugt reagensbeholder – sørg da for, at genbrugs-forseglingsstrips er fjernet.
- Sørg for at åbne enzymrørene.
- Hvis prøverne er forsynet med stregkoder, vendes prøverne i glasholderen sådan, at stregkoderne vender mod stregkodelæseren i venstre side af QIASymphony SP.

Procedure

1. Luk alle skuffer og stinkskalet.
2. Tænd for QIASymphony SP, og vent, indtil skærmen **Sample Preparation** (Prøveklargøring) vises, og initieringsproceduren er færdig.
Afbryderkontakten sidder i nederste venstre hjørne af QIASymphony SP.
3. Log på instrumentet.
4. Vælg den protokol, der skal køres.
Vælg knappen **Select All** (vælg alle), og vælg **DNA Blood** (DNA blod) og derefter **Blood_200_V7_DSP** for helblodsprøver.
5. Kontroller, at skuffen "Waste" (affald) er klargjort korrekt. Udfør en indholdsscanning af "Waste"-skuffen, inkl. spidsslisen og væskeaffaldsbeholderen. Udskift om nødvendigt spidsaffaldsposen.
6. Indsæt det påkrævede eluerings-rack i skuffen "Eluate" (eluat).
Sæt ikke en 96-brønds plade i "Elution slot 4" (Elueringsposition 4).
Brug kun "Elution Slot 1" (Elueringsposition 1) sammen med den tilhørende køleadapter.

Når du bruger en plade med 96 brønde, skal det sikres, at pladen vender rigtigt, da en forkert placering kan forårsage forveksling af prøven i efterfølgende analyser.

7. Indsæt de(n) nødvendige reagensbeholder(er) og forbrugsvarer i skuffen "Reagents and Consumables" (reagenser og forbrugsartikler).

Bemærk: Kontroller, at pipettespidserne er fastgjort korrekt i skuffen.

8. Foretag en indholdsscanning af skuffen "Reagents and Consumables".
9. Overfør 300 µl af den helblodsprøve, der skal ekstraheres, til et mikrorør (2,0 ml Type H), og placer det i 3B 2-ml-adapteren på prøverørsholderen.
Sæt prøverørene i skuffen "Sample" (Prøve).

10. Brug berøringsskærmen til at indlæse de nødvendige oplysninger for hvert batch af prøver, der skal behandles:

- Prøveinformation: Du kan ændre standardrørformat ved at vælge **Select All** og vælge **Sarstedt reference 72.694** i arket **Tube Insert** (rørindsats).
- Bekræft den valgte protokol: **Blood_200_V7_DSP**.
- Elueringsvolumen og afgivet placering: Vælg **100 µl** for helblodsprotokollen.

Bemærk: Når oplysninger om batch er indlæst, ændres status fra **LOADED** (indsat) til **QUEUED** (i kø). Så snart et batch er i kø, vises knappen **Run** (kør).

11. Start kørslen ved at trykke på knappen **Run**.

12. Læs og bekræft den viste meddelelse.

Bemærk: Vi anbefaler, at du venter ved siden af instrumentet, indtil det har udført væskestandsdetektion i rørene med interne kontroller, og QIAsymphony SP-holderstatus skifter til **RUNNING** (i gang).

Bemærk: Du må ikke holde pause i eller stoppe kørslen under behandling (medmindre der opstår en nødsituation), da det vil føre til, at prøverne markeres som "unclear" (uklare).

Bemærk: Det er muligt at indsætte prøver kontinuerligt og føje dem til denne kørsel (indtil reagenser er indsat). Tryk på knappen **Run** for at starte oprensningsproceduren.

13. I slutningen af protokolkørslen ændres batchstatus fra **RUNNING** til **COMPLETED** (færdig).

Hent elueringsracket med de oprensede nukleinsyrer fra skuffen "Eluate".

Vi anbefaler at fjerne eluatpladen fra skuffen "Eluate", straks efter at kørslen er færdig.

Afhængigt af temperatur og fugtighed kan elueringsplader, der efterlades i QIASymphony SP efter, at kørslen er færdig, blive udsat for kondensering eller fordampning.

14. Eksporter QIASymphony SP-resultatfilen: Denne rapport genereres for hver elueringsplade.

14a. Sæt USB-nøglen i en af USB-portene på forsiden af QIASymphony SP.

14b. Klik på knappen **Tools** (værktøjer).

14c. Vælg **File Transfer** (filoverførsel).

14d. På fanen **In-/Output Files** (in-/outputfiler) skal du vælge **Results Files** (resultatfiler) og klikke på **Transfer** (overfør).

Hold navnet på fileksporten i følgende format:

åååå-mm-dd tt:mm:ss_Eluerings-rack-id.

15. Kontroller kolonnen **Validity of result** (resultatets gyldighed) for hver prøve i QIASymphony SP-resultatfilen.

- Status "Valid" (gyldig) og "Unclear": Fortsæt til DNA-kvalificering og -kvantificering
- Ugyldig status: prøven afvises. Udfør ekstraheringstrinnet igen

16. Hvis en reagensbeholder kun anvendes delvist, skal den forsegles med de medfølgende genbrugsforseglingsstrips, og rør, der indeholder proteinase K, lukkes med skruehætter umiddelbart efter afslutningen af protokolkørslen for at undgå fordampning.

17. Kasser brugte prøverør, plader og affald i henhold til de lokale sikkerhedsbestemmelser.

18. Rengør QIASymphony SP.

Følg vedligeholdelsesanvisninger i de QIASymphony SP-brugervejledninger, der leveres med dit instrument. Sørg for at rengøre spidsbeskytterne jævnligt for at mindske risikoen for krydskontaminering.

19. Luk instrumentets skuffer, og sluk for QIAasympyphony SP.

Generelt overføres magnetiske partikler ikke til eluater. Hvis eluatet indeholder sorte partikler, kan de magnetiske partikler fjernes på følgende måde:

- Sæt glasset med DNA i en egnet magnetisk separator (f.eks. QIAGEN 12-Tube Magnet, kat.nr. 36912), indtil magnetiske partikler er separeret.
- Hvis DNA'et er i mikroplader, sættes mikropladen på en egnet magnetisk separator (f.eks. QIAGEN 96-Well Magnet Type A, kat.nr. 36915), indtil de magnetiske partikler er separeret.
- Hvis der ikke er egnet, magnetisk separator til rådighed, centrifugeres glasset, der indeholder DNA, i 1 minut ved maksimalt omdrejningstal i en mikrocentrifuge for at pelletere alle resterende, magnetiske partikler.

Kvantificering og bestemmelse af DNA-renhed

De elueringsbuffere, der anvendes i gDNA-ekstraktionskittene, indeholder konserveringsmidlet natriumazid. Natriumazid absorberer ved 260 nm, og derfor skal der udføres en blindbestemmelse for at kalibrere spektrofotometeret. Afhængigt af ekstraktionsprotokollen skal elueringsbufferen anvendes som blindbestemmelse.

- A_{260}/A_{280} -forholdet skal være $\geq 1,7$. Mindre forhold indikerer normalt proteinkontamination eller tilstedeværelse af organiske kemikalier, som påvirker PCR-trinnet negativt.
- Koncentrationen af DNA bestemmes ved at måle absorbansen ved 260 nm. Absorbansudlæsningerne ved 260 nm skal ligge mellem 0,1 og 1,0 for at være nøjagtige. Absorption af 1 enhed ved 260 nm svarer til 50 µg DNA pr. ml ($A_{260} = 1 = 50 \text{ µg/ml}$).
Den samlede mængde oprenset DNA (ng) = koncentration af DNA (ng/µl) x volumen af prøven (µl).
- Hvis A_{260}/A_{280} -forholdet er under 1,7, og/eller hvis gDNA-koncentrationen er under 10 ng/µl, må prøven ikke behandles yderligere.

Normalisering af genomisk DNA-prøve

Fortynd DNA'et til 10 ng/µl i TE-buffer, der medfølger i *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet.

Rotor-Gene Q MDx PCR-reaktionen er optimeret til 50 ng rensset gDNA fortyndet i et endeligt prøvevolumen på 5 µl.

Protokol: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument*

ipsogen CALR RGQ PCR-kittet skal køres på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med automatisk tolkning af resultater med Rotor-Gene AssayManager v2.1. Cyclingparametrene er låst for kørslen.

Sørg for at være fortrolig med Rotor-Gene Q MDx-instrumentet og med Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren, før protokollen påbegyndes. Se brugervejledningerne til instrumentet, Rotor-Gene AssayManager v2.1, og Gamma Plug-in'en for at få detaljerede oplysninger.

Installation af Gamma-Plug-in og import af analyseprofilen

Rotor-Gene AssayManager v2.1-software skal installeres på den computer, der er tilsluttet til Rotor-Gene Q MDx. Softwaren kan downloades på "**Operating Software**" (driftssoftware) på fanen "**Product Resources**" (produktressourcer) på produktsiden til Rotor-Gene AssayManager v2.1 på www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx.

For yderligere oplysninger om installation af Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core-softwaren henvises til brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual)*. For oplysninger om yderligere software på tilsluttede computere henvises til lynvejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide)*.

Til automatisk tolkning af resultater med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet ved hjælp af Rotor-Gene AssayManager v2.1 skal den seneste Gamma-plug-in være installeret på Rotor-Gene AssayManager v2.1. Se "**Product Resources**" på produktsiden til Rotor-Gene AssayManager

* Hvis det er relevant, et Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med en fremstillingsdato fra januar 2010 eller senere. Produktionsdatoen findes under serienummeret på bagsiden af instrumentet. Serienummeret findes i formatet "mmåånnnn", hvor "mm" står for produktionsmåneden i tal, "åå" står for de sidste to tal i produktionsåret, og "nnn" står for den entydige instrumentidentifikator.

v2.1 på www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx for at få adgang til den nyeste version af denne plug-in.

Se afsnittet "Installing Plug-ins" (installation af plug-ins) i brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* for at få en nærmere beskrivelse af installation af plug-in'en.

ipsogen CALR RGQ PCR-kittet kræver også en analyseprofil. Analyseprofilen indeholder alle nødvendige parametre for cykling og analyse af qPCR-analysen. CALR-analyseprofilen (*ipsogen_CALR_blood_CE*) svarer til en .iap-fil, der kan downloades fra produktsiden for *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet på fanen **Product Resources** under **Protocol Files** (protokolfiler). Analyseprofilen skal importeres i Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren.

For detaljerede oplysninger om installation af Gamma-plug-in og testprofil henvises til brugermanualen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* og brugermanualen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

1. Download både Gamma Plug-in'en og den seneste version af CALR-analyseprofilen fra www.qiagen.com.
2. Start installationsprocessen ved at dobbeltklikke på filen **RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi**, og følg installationsvejledningen.

Se afsnittet "Installing Plug-ins" (installation af plug-ins) i brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager Core Application* for at få en nærmere beskrivelse.

Bemærk: Af hensyn til systemmæssig processikkerhed skal følgende konfigurationsindstillinger angives for den lukkede tilstand:

- Vælg fanen **"Settings" (indstillinger)** i miljøet "Configuration" (**konfiguration**).
- I panelet "Work list" (arbejdsliste) under "Closed mode" (lukket tilstand) skal du markere afkrydsningsfelterne **"Material number required" (materialenr. påkrævet)**, **"Valid expiry date required" (gyldig udløbsdato påkrævet)** og **"Lot number required" (lotnummer påkrævet)**.

Dette kan kun gøres af en bruger med "Administrator"-rettigheder.

3. Når Gamma Plug-in'en er installeret, skal du importere CALR -analyseprofilen (.iap file). Log på Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren som bruger med "Administrator"-rettigheder til Rotor-Gene AssayManager v2.1.
4. Vælg "Configuration Environment" (konfigurationsmiljø)
5. Vælg fanen "**Assay Profiles**" (analyseprofiler).
6. Klik på knappen "Import" (importer).
7. Vælg CALR-analyseprofil-filen *ipsogen_CALR_blood_CE* i dialogboksen til åbning af fil.
8. Klik på "Open" (åbn). Analyseprofilen indlæses og tilføjes til listen over tilgængelige analyseprofiler og kan anvendes i miljøet "**Setup**" (opsætning).

Bemærk: Samme version af en analyseprofil må ikke importeres to gange.

Konfiguration af isætningsblok og rotor

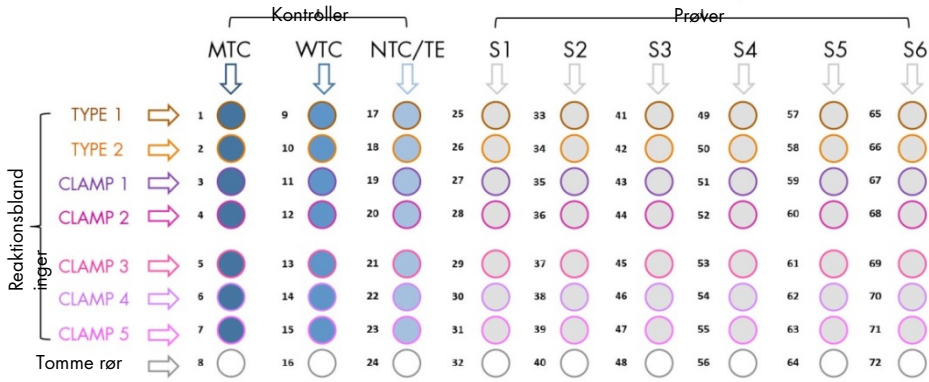
Vi anbefaler at teste 6 gDNA-prøver på samme eksperiment for at optimere brug af kontrollerne og reaktionsblandingerne.

Hver reaktionsblanding (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 og CALR CLAMP 5) anvendes til 9 reaktioner: 6 prøver af gDNA og 3 eksterne kontroller [1 CALR Mutant Control (MTC), 1 CALR Wild-Type Control (WTC) og 1 No Template Control (NTC = TE-buffer, der medfølger i *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet)].

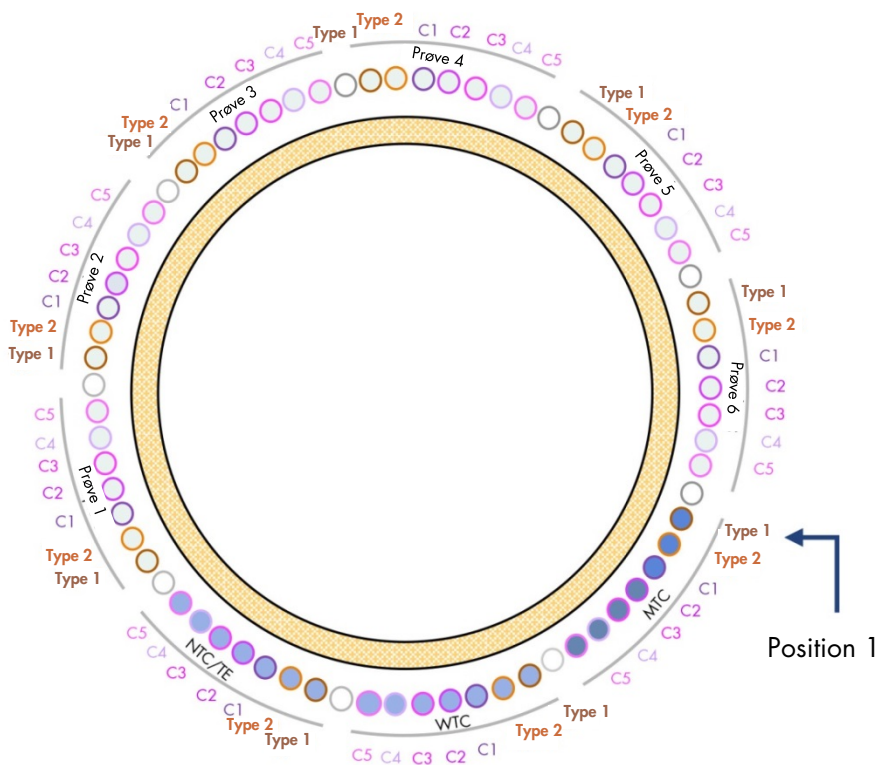
De skemaer, der er vist i figur 4 og figur 5, giver en illustration af konfigurationen af isætningsblokken og rotoren for et optimeret eksperiment med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet.

Placeringen af CALR-reaktionsblandinger og -kontroller er indstillet i CALR-analyseprofilen og kan ikke ændres. Hvis blandingerne/kontrollerne ikke placeres som angivet nedenfor, kan den automatiske resultatanalyse ikke udføres.

Tallene i figur 4 angiver positioner i isætningsblokken og indikerer den endelige rotorposition.



Figur 4. Isætningsblokkonfiguration til et eksperiment med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet. TYPE 1: CALR-reaktionsblanding TYPE 1; TYPE 2: CALR-reaktionsblanding TYPE 2; CLAMP 1: CALR-reaktionsblanding CLAMP 1; CLAMP 2: CALR-reaktionsblanding CLAMP 2; CLAMP 3: CALR-reaktionsblanding CLAMP 3; CLAMP 4: CALR-reaktionsblanding CLAMP 4; CLAMP 5: CALR-reaktionsblanding CLAMP 5; MTC: CALR Mutant Control (mutantkontrol); WTC: CALR Wild-Type Control (vildtype-kontrol); NTC/TE: No Template Control (kontrol uden skabelon (TE); S1–S6: gDNA-prøver.



Figur 5. Rotorkonfiguration til et eksperiment med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet.

Fra position 1 MTC: CALR Mutant Control (mutantkontrol); WTC: CALR Wild-Type Control (vildtype-kontrol); NTC/TE: No Template Control (kontrol uden skabelon) (TE); Type 1: CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) TYPE 1; Type 2: CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) TYPE 2; C1: CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) CLAMP 1; C2: CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) CLAMP 2; C3: CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) CLAMP 3; C4: CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) CLAMP 4; C5: CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) CLAMP 5; Prøve 1 til Prøve 6: gDNA-prøver. **Bemærk:** Alle de resterende positioner ○ skal være fyldt med tomme rør.

Oprettelse af en arbejdsliste

De overordnede funktionaliteter i miljøet "Setup" og "Creating/Editing a Work List" (oprettelse/redigering af en arbejdsliste) beskrives i brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application.

Bemærk: Arbejdslistefilen kan gemmes. Arbejdslisten kan oprettes før isætning af prøver i instrumentet, eller når eksperimentet er konfigureret i instrumentet.

1. Tænd Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.
2. Åbn Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren, og log på som bruger med rollen "Operator" (operatør) i lukket tilstand.
3. Vælg miljøet "Setup".
4. Klik på knappen "**New manual work list**" (ny manuel **arbejdsliste**) i arbejdslisteoversigten.
5. Vælg CALR-analyseprofilen fra listen over tilgængelige analyseprofiler.
6. Klik på "Move" (flyt) for at overføre den valgte analyseprofil til listen "**Selected assay profiles**" (**valgte analyseprofiler**). Analyseprofilen bør nu blive vist i listen "**Selected assay profiles**".
7. Angiv antal prøver (op til 6) i det tilsvarende felt.
8. Vælg trinnet "**Kit Information**" (kit-oplysninger). Brug kit-stregkoden, eller indtast manuelt følgende kit-oplysninger fra låget på *ipsogen* CALR RGQ PCR-kit-æskens:
 - Materialenummer 1100703
 - Gyldig udløbsdato
 - Lot-nummer
9. Vælg trinnet "**Samples**" (**prøver**). Der vises en liste med prøveoplysninger. Denne liste repræsenterer det forventede layout af rotoren.

10. Indtast prøveidentifikationsnummer eller -numre i denne liste samt eventuelle valgfri prøveoplysninger såsom en kommentar til hver prøve.
11. Vælg "Properties" (**egenskaber**), og indtast et arbejdslistenavn.
12. Marker afkrydsningsfeltet "**Worklist is complete**" (**arbejdslisten er færdig**) (**kan anvendes**).
13. Gem arbejdslisten.
14. Tryk **på "Print work list" (udskriv arbejdsliste)** for at udskrive arbejdslisten.
Udskrivning af arbejdslisten kan være en hjælp ved klargøring og konfiguration af qPCR.
Prøveoplysninger medtages som en del af arbejdslisten.

Konfiguration af qPCR

Ting, der skal gøres før start

- Optø alle nødvendige komponenter undtagen *Taq* DNA-polymerase, enzymet skal opbevares i fryseren, når det ikke bruges. Anbring glassene med de komponenter, der skal optøes, på is eller en køleblok.
 - Rengør det bordareal, som skal bruges til klargøring af PCR-blanding, for at mindske risikoen for skabelon- eller nukleasekontaminering.
 - Vortex-bland (10-12 sekunder), og centrifuger derefter kortvarigt rørene med standarder, kontroller og reaktionsblandinger før brug.
1. Klargør qPCR-masterblandinger til hvert reaktionsvolumen (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 og CALR CLAMP 5) **på is** (eller ved hjælp af en køleblok) i henhold til antallet af prøver, som skal behandles.
Pipetteringsskemaet til klargøring af alle CALR-reagens-masterblandinger, der er vist i nedenstående tabel, er beregnet til at kunne opnå endelige reaktionsvolumener på 25 µl efter tilsætning af 5 µl gDNA eller kontrol. Der er inkluderet ekstra volumen for at kompensere for pipetteringsfejl og for at tillade klargøring af tilstrækkelig reaktionsmasterblanding til 6 prøver plus 3 eksterne kontroller.

Komponent	1 reaktion (µl)	9 + 1 reaktioner (µl)*
CALR Reaction Mix (reaktionsblanding)	19,83	198,3
Taq-DNA-polymerase	0,17	1,7
Samlet volumen af qPCR-masterblanding (µl)	20	200
Distribution af qPCR-masterblanding	20 µl pr. rør	
Prøvedistribution	5 µl pr. rør	
Samlet volumen af qPCR-reaktion	25 µl	

* Der er inkluderet et ekstra reaktionsvolumen for at kompensere for pipetteringsfejl.

Bemærk: Vi anbefaler, at du ikke pipetterer volumener under 1 µl.

2. Vortex-bland og centrifuger kortvarigt alle qPCR-masterblandinger.
3. Placer qPCR-striprørene på en afkølet Loading Block (isætningsblok) til 72 x 0,1-ml rør, og dispenser 20 µl af CALR qPCR-masterblandingerne pr. stripsrør i henhold til konfigurationen af isætningsblokken som vist i Figure 4.
4. Vortex-bland og centrifuger kortvarigt gDNA-prøver, CALR Wild-Type Control (vildtypekontrol) (WTC), CALR Mutant Control (mutantkontrol) (MTC) og TE Buffer (NTC). Tilsæt derefter 5 µl af prøven eller kontrolmaterialet i det respektive rør i overensstemmelse med konfigurationen i Figure 4, så der opnås et samlet volumen på 25 µl. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.

Bemærk: Vær omhyggelig med at skifte spidser mellem hvert rør for at undgå falsk positive resultater fra kontaminering fra eventuel ikke-specifikke skabelon eller reaktionsblanding. Luk alle slanger, og kontroller, at der ikke er bobler i bunden af rørene.

5. Returner alle komponenter i *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet til de korrekte opbevaringsforhold for at undgå eventuel materialeforringelse.

Klargøring af Rotor-Gene MDx og start af qPCR-kørslen

1. Sæt en rotor med 72 brønde i Rotor-Gene Q MDx-rotorholderen.
2. Fyld rotoren med striprør i henhold til de tildelte positioner, startende i position 1, som vist i Figure 5 med tomme rør med låg i alle positioner, der ikke skal anvendes.

Bemærk: Kontroller, at det første rør er sat i position 1, og at striprørene er anbragt i den rigtige retning og position som vist i Figure 4 og Figure 5.

Bemærk: Hold altid TYPE 1-reaktionsblandingen og de tre kontroller (MTC, WTC, NTC) i positionerne 1, 9 og 17, således at optimering (udført på rørposition 1) altid udføres på samme amplifikation (se Figure 4 og Figure 5).

3. Monter låseringen.
4. Sæt rotoren med låseringen i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet. Luk instrumentlåget.
5. I Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren skal du vælge den tilsvarende arbejdsliste fra arbejdslisteoversigten og klikke på **"Apply" (anvend)**.

Hvis arbejdslisten stadig åben, skal også blot klikke på **knappen "Apply"**.

Bemærk: Hvis der ikke er oprettet en dedikeret arbejdsliste til eksperimentet, kan du logge på Rotor-Gene AssayManager v2.1 og følge trinnene i "Creating a work list," side 37, før du fortsætter.

6. Indtast eksperimentnavnet.
7. Vælg den cyclus, der skal anvendes, i "Cycler selection" (vælg cyclus). Der skal anvendes en Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-cyclus.
8. Kontroller at låseringen er korrekt fastgjort, og bekræft på skærmen, at låseringen er monteret.
9. Klik på **"Start Run"** (start kørsel).
qPCR-kørslen bør starte.
10. Når kørslen er afsluttet, skal du klikke på "Finish run" (afslut kørsel).

Bemærk: Indtil dette trin er afsluttet, gemmes eksperimentet ikke i den interne database.

Frigiv og rapporter qPCR-resultater

Den generelle funktionalitet af miljøet **Approval** (godkendelse) er beskrevet i brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

Når en kørsel er færdig, og cyklusapparatet er slukket, gemmes eksperimentet i den interne database. Analysen af de indsamlede data udføres automatisk afhængigt af det plugin, der svarer til analyseprofilen, og de regler og parameterværdier, der er defineret af analyseprofilen.

Bemærk: Brugeren skal have rollen "Approver" i (godkender) for at godkende en kørsel.

Det første trin i godkendelsesprocessen er at filtrere den analyse, der skal godkendes. Dette gøres ved at anvende filtreringskriterier i miljøet **Approval**.

1. Frigiv og godkend kørslen.

En bruger, der er logget ind med rollen "Approver" skal klikke på **"Release and go to approval"** (frigiv og gå til godkendelse).

For brugere, der er logget ind med rollen "Operator", klikkes på "Release" (frigiv).

Hvis **der blev klikket på "Release and go to approval"**, vises resultaterne af eksperimentet i miljøet "Approval".

Hvis der **blev klikket på "Release"** af en bruger med rollen "Operator", skal en person med rollen "Approver" logge på og vælge miljøet "Approval".

2. Vælg filterindstillinger til den analyse, der skal godkendes, og klik på **"Apply"**.

3. Gennemse resultaterne, og klik på **knappen Release/Report data (frigiv/rapporter data)**.

4. Klik på OK.

Rapporten genereres i .pdf-format og gemmes automatisk i den foruddefinerede mappe.

Standardmappestien er **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports**.

Bemærk: Denne sti og mappe kan ændres i miljøet **"Configuration"**.

5. Tøm Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og bortskaf striprørene ifølge de lokale sikkerhedsregler.

Bemærk: Der kræves en supportpakke fra kørslen for at få hjælp med fejlfinding fra QIAGENs tekniske supportafdeling. Supportpakker kan oprettes fra miljøerne "Approval" eller "**Archive**" (arkiver). For at få yderligere oplysninger henvises der til afsnittet "Creating a support package" (oprettelse af en supportpakke) i brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Udover supportpakken kan historikposten fra ± 1 dag fra tidspunktet for en hændelse muligvis være til nytte. Historikposten kan hentes i miljøet "Service". For at få yderligere oplysninger henvises der til brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Fortolkning af resultater

Dataanalyse

Analysen af qPCR-resultaterne for hver enkelt analyse og prøve er fuldstændig automatiseret. Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyserer amplifikationskurver og kan ugyldiggøre ikke-konforme kurver, afhængigt af deres udformning og støjamplicitude. Hvis dette er tilfældet, vil der blive tilknyttet et flag til den ugyldiggjorte kurve. Advarselsflag kan også blive vist for ikke-invaliderende kurveanomalier.

For at bestemme analysens gyldighed analyserer Rotor-Gene AssayManager v2.1 også kørselskontrollerne, dvs. CALR Wild-Type Control (vildtypekontrol) (WTC), CALR Mutant Control (mutantkontrol) (MTC) og TE Buffer (NTC) i den grønne (FAM) og gule (HEX) kanal for *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittets reaktionsblandinger (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 og CALR CLAMP 5). Gyldigheden for hver kontrol forudsætter overholdelse af C_T-værdier med foruddefinerede specifikationer.

Bemærk: Hvis den interne amplifikationskontrol i et givet rør er ugyldig (gul kanal), anses det CALR-specifikke mål i samme rør (grøn kanal) for ugyldigt.

Bemærk: Hvis mindst én ekstern kontrol er ugyldig for en given CALR-analyse (f.eks. CLAMP 1-analysen), anses de resultater, der er opnået med den pågældende reaktionsblanding for alle testprøver for ugyldig. I dette tilfælde er kun den givne CALR-analyse ugyldig og ikke hele qPCR-kørslen.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyserer også ukendte prøver ved at kontrollere gyldigheden af den interne ABL1-kontrol.

Endelig vil en CALR-status blive tildelt til ukendte prøver. I det første tilfælde bruger softwaren de resultater, der er opnået for TYPE 1- og TYPE 2-analyserne. Hvis enten positiv

mutationsstatus af enten type 1 eller type 2 tildeles til en prøve, bestemmes CALR-status. De opnåede resultater for CLAMP-analyserne vises til orientering.

Hvis hverken type 1- eller type 2-mutation identificeres, kan analysen fortsættes med resultater, der er opnået for CLAMP-analyserne, indtil CALR-status (dvs. mutation påvist eller ingen mutation påvist) bestemmes.

For at konkludere at en prøve er positiv, kræves påvisning med mindst én af de syv CALR-analyser. Alle kontroller, der er forbundet med de pågældende analyser og kontrollen i den analyserede prøve, skal være gyldige, dvs. MTC, WTC, NTC og intern ABL1-kontrol.

For at konkludere at en prøve er negativ, skal prøven være negativ med alle analyser, og alle kontroller (MTC, WTC og NTC) fra alle syv CALR-analyser, samt den interne ABL1-kontrol i prøven, skal være gyldige.

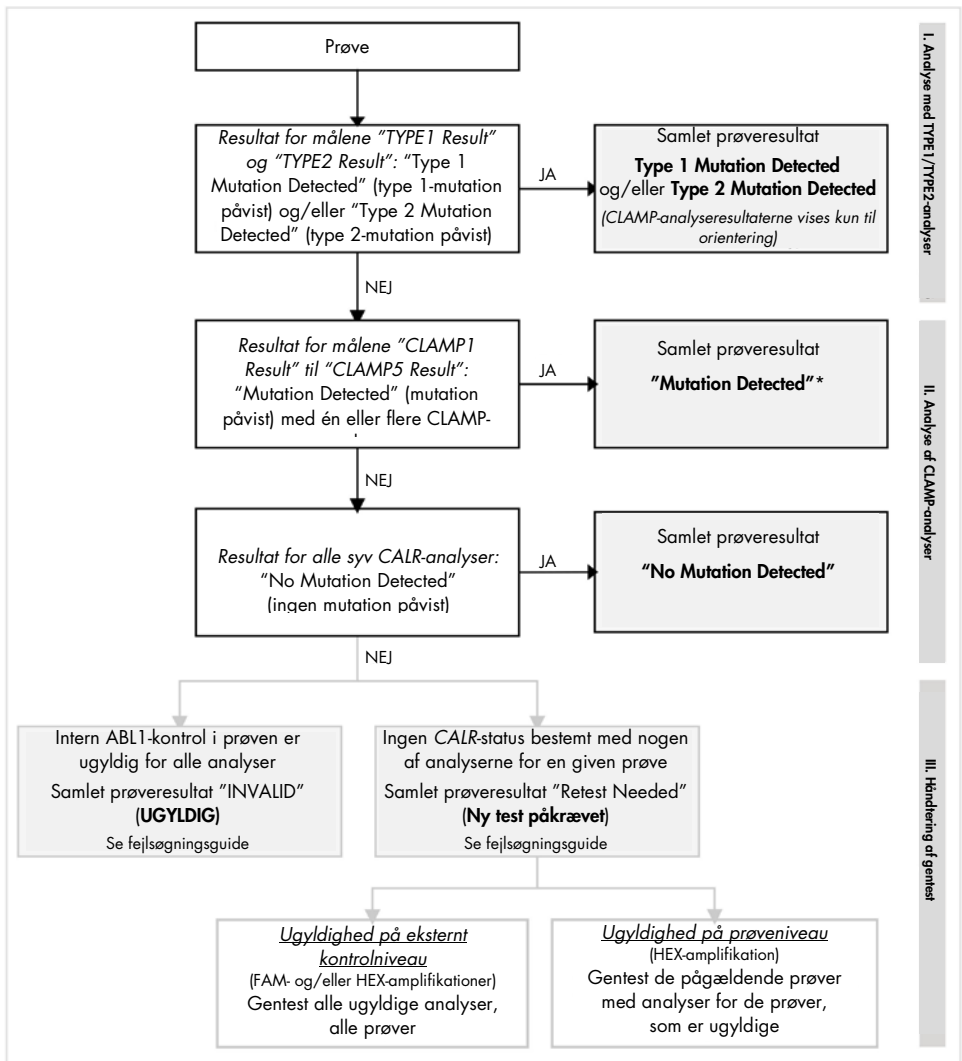
Resultaterne af testprøverne, der analyseres og indstilles automatisk af Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren, skal godkendes og frigives af en bruger, der er logget ind med rolle som "Approver". Prøveresultaterne, der skal godkendes, har tre ekstra godkendelsesknapper for enden af den dedikerede række. Disse knapper anvendes til interaktivt at acceptere eller afvise prøveresultaterne. Du kan få yderligere oplysninger i brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

I tilfælde af ugyldige resultater henvises til "Troubleshooting guide", side 54, for at afklare årsagen til fejlen og muligvis identificere eventuelle fejl, der skal udbedres.

Gentest

I tilfælde af ugyldige resultater skal du følge beslutningsdiagrammet i figur 6 for at vurdere behovet for gentest.

Gentest bør ikke være nødvendige, hvis en CALR-status kan knyttes til de pågældende prøver med en hvilken som helst af de syv CALR-analyser.



* I tilfælde hvor Type 1/Type 2-identifikation er obligatorisk, og TYPE 1- og/eller TYPE 2-analysen er ugyldig, kan en gentest være nødvendig — trods en positiv CLAMP-analyse — for at opnå et entydigt resultat TYPE 1- og/eller TYPE 2-analysen.

Figur 6. Beslutningsdiagrammet til at bestemme CALR-mutationsstatus for analyseprøver.

Bemærk: I tilfælde hvor Type 1/Type 2-identifikation er obligatorisk, og TYPE 1- og/eller TYPE 2-analysen er ugyldig, kan en gentest være nødvendig — trods en positiv CLAMP-analyse — for at opnå et entydigt resultat TYPE 1- og/eller TYPE 2-analysen.

Gentest kan være påkrævet i andre tilfælde. Når du udfører gentest, skal du altid holde TYPE 1-reaktionsblandingen og de tre kontroller (MTC, WTC, NTC) i positionerne 1, 9 og 17, således at optimering (udført på rørposition 1) altid udføres på samme amplifikation. Sørg for at anbringe hver gentestet analyse i dens egen tildelte position (Figure 4), også selvom ikke alle analyser er til stede på pladen.

Bemærk: Hvis nogen af de syv CALR-analyser mangler, når prøverne er gentestes, vil alle tomme positioner, der normalt er fyldt, udløse responset "INVALID" (ugyldig) fra softwaren. For at opnå bedre sporbarhed skal tomme positioner og det forventede respons på disse dokumenteres kommentarafsnittet i rapporten.

Visning af resultater

Mål

Resultaterne for hver analyse med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet vises under følgende målnavne:

- "ABL_AssayName" (f.eks. ABL_TYPE_1) for den interne ABL1-amplifikationskontrol (resultater i gul kanal)
- "AssayName" for en CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) (f.eks. TYPE 1 for CALR Reaction Mix (reaktionsblanding) TYPE 1) (resultater i grøn kanal)
- "AssayName Result" (f.eks. TYPE 1 Result). Disse mål er kombinerede mål; det tilsvarende resultat tager højde for gyldigheden af kontrollerne (MTC, WTC, NTC og ABL1).

Resultater

Resultaterne af ovennævnte mål vises i kolonnen **“Result” (resultat)** i rapporten.

Tabel 3. Viste resultater for hvert mål

Mål	Prøver	Viste resultater
ABL_AssayName (f.eks. ABL_TYPE_1)	MTC, WTC, NTC, testprøver	“Internal Control Valid, INVALID” (intern kontrol gyldig, ugyldig)
AssayName (f.eks. TYPE 1)	MTC, WTC, NTC	“Signal, No Signal, INVALID” (Signal, intet signal, ugyldig)
AssayName (f.eks. TYPE 1)	Testprøver	Significant Amplification Detected (væsentlig amplifikation påvist), No Significant Amplification Detected (ingen væsentlig amplifikation påvist), No Amplification Detected (ingen amplifikation påvist), INVALID
TYPE 1-resultat	Testprøver	Type 1 Mutation Detected, No Mutation Detected, INVALID
TYPE 2-resultat	Testprøver	Type 2 Mutation Detected, No Mutation Detected, INVALID
CLAMP X Result (f.eks. CLAMP 1 Result)	Testprøver	Mutation Detected, No Mutation Detected, INVALID

Hvis en af kontrollerne (MTC, WTC, NTC) forbundet med en given prøve er ugyldig for en given analyse, eller hvis den interne ABL1-kontrol er ugyldig, vises resultatet for det samlede målresultat som “INVALID”.

Konklusionen på analysen for hver prøve vises i kolonnen Overall Sample Result (samlet prøveresultat) i rapporten.

Tabel 4. Samlede prøveresultater

Prøveresultat	Beskrivelse
Type 1 Mutation Detected	Den analyserede prøve bærer type 1-CALR-mutationen.
Type 2-mutation påvist	Den analyserede prøve bærer type 2-CALR-mutationen.
Type 2 Mutation Detected	Den analyserede prøve bærer type 1- og type 2-CALR-mutationerne. Denne begivenhed er sjælden, men observeret flere gange under den kliniske validering af <i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR-kittet.
Mutation Detected	Den analyserede prøve bærer en CALR-mutation ud over type 1 eller type 2.
"No Mutation Detected"	Det er ikke muligt at påvise en CALR-mutation i den analyserede prøve.
Retest Needed	Resultatet er usikkert pga. ugyldighed af en eller flere kontroller for en eller flere CALR-reaktionsblandinger. Det er nødvendigt at foretage en gentest for at opnå et entydigt resultat (se figur 6). Eksempel: Prøven er positiv (dvs. "Significant Amplification Detected" (markant amplifikation påvist)) med CLAMP1-analysen alene, men NTC til CLAMP1-analysen er ugyldig pga. kontaminering i brønden. Prøveresultatet for CLAMP1 kan ikke accepteres, og CLAMP1-resultatet vises som INVALID (ugyldig). Det er nødvendigt at foretage en gentest for CLAMP 1-analysen (MTC, WTC, NTC og den pågældende prøve) for at bekræfte et positivt resultat af prøven.
INVALID	Den interne ABL1-amplifikationskontrol er ugyldig for den analyserede prøve med alle syv CALR-reaktionsblandinger, mens alle eksterne kontroller (MTC, WTC, NTC) er gyldige. Dette skyldes sandsynligvis prøvekvaliteten eller en forkert prøvenormalisering. Se "Troubleshooting guide" på side 54 for yderligere oplysninger.

Flag

Flagene angiver supplerende oplysninger om opnåede resultater, især ugyldige resultater. Uproblematiske anomalier kan mærkes med et advarselsflag, der ikke fører til et ugyldigt resultat. Du kan få yderligere oplysninger om universelle flag i brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

Den automatiserede analyse af *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet giver muligvis følgende analysespecifikke og universelle flag:

Flag	Beskrivelse
Analysespecifikke flag	
CONSECUTIVE_FAULT	Et mål, der anvendtes til beregningen af dette mål, er ugyldigt.
IC_INVALID	Den interne kontrol er ugyldig. Mål og intern kontrol deler rør.
INVALID_SIGNAL	Flag, der kun vedrører NTC C _T -værdien er for lav til den interne kontrol eller den CALR-specifikke amplifikation.
MC_HIGH_CT (CLAMP X)	C _T -værdien er for høj til mutantkontrollen.
MC_HIGH_CT (TYPE X)	C _T -værdien er for høj til mutantkontrollen.
MC_IC_HIGH_CT (CLAMP X)	C _T -værdien er højere end forventet for den interne kontrol i røret med mutantkontrollen.
MC_IC_HIGH_CT (TYPE X)	C _T -værdien er højere end forventet for den interne kontrol i røret med mutantkontrollen.

Flag	Beskrivelse
MC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	C _T -værdien er lavere end forventet for den interne kontrol i røret med mutantkontrollen.
MC_IC_LOW_CT (TYPE X)	C _T -værdien er lavere end forventet for den interne kontrol i røret med mutantkontrollen.
MC_LOW_CT (CLAMP X)	C _T -værdien er for lav til mutantkontrollen.
MC_LOW_CT (TYPE X)	C _T -værdien er for lav til mutantkontrollen.
MC_NO_CT (CLAMP X)	Ingen målbar C _T til mutantkontrollen med CLAMP X-reaktionsblandingen.
MC_NO_CT (TYPE X)	Ingen målbar C _T til mutantkontrollen med TYPE X-reaktionsblandingen.
NO_SIGNAL_IC_INVALID	Der detekteres intet internt kontrolsignal. Mål og intern kontrol deler rør.
NTC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	C _T -værdien er for lav til den interne kontrol i røret med ingen skabelon-kontrollen.
NTC_IC_LOW_CT (TYPE X)	C _T -værdien er for lav til den interne kontrol i røret med ingen skabelon-kontrollen.
NTC_LOW_CT (CLAMP X)	C _T -værdien er for lav til No Template Control (ingen skabelon-kontrollen).
NTC_LOW_CT (TYPE X)	C _T -værdien er for lav til No Template Control (ingen skabelon-kontrollen).

Flag	Beskrivelse
SAMPLE_CLAMP X_IC_HIGH_CT	C _T -værdien er højere end forventet for den interne kontrol i et prøverør.
SAMPLE_CLAMP X_IC_LOW_CT	C _T -værdien er lavere end forventet for den interne kontrol i et prøverør.
SAMPLE_TYPE X_IC_HIGH_CT	C _T -værdien er højere end forventet for den interne kontrol i et prøverør.
SAMPLE_TYPE X_IC_LOW_CT	C _T -værdien er lavere end forventet for den interne kontrol i et prøverør.
WTC_IC_HIGH_CT (CLAMP X)	C _T -værdien er højere end forventet for den interne kontrol i røret med WT.
WTC_IC_HIGH_CT (TYPE X)	C _T -værdien er højere end forventet for den interne kontrol i røret med WT.
WTC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	C _T -værdien er lavere end forventet for den interne kontrol i røret med WT.
WTC_IC_LOW_CT (TYPE X)	C _T -værdien er lavere end forventet for den interne kontrol i røret med WT.
WTC_LOW_CT (CLAMP X)	C _T -værdien er for lav til WT-kontrollen.
WTC_LOW_CT (TYPE X)	C _T -værdien er for lav til WT-kontrollen.

Andre flag

Flag	Beskrivelse
ANALYSIS_FAILED	Analysen er sat til ugyldig, fordi analysen mislykkedes af forskellige årsager. Kontakt QIAGENs tekniske service.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Rådataene for amplifikationskurven har en facon der afviger fra den fastlagte adfærd for denne analyse. Der er en høj sandsynlighed for ukorrekte resultater eller fejlfortolkning af resultater.
FLAT_BUMP	Rådataene for amplifikationskurven har en facon som ligner en flad bule og afviger fra den fastlagte adfærd for denne analyse. Der er høj sandsynlighed for, at ukorrekte resultater eller fejlfortolkning af resultater opnås (dvs. forkert bestemmelse af C_T -værdi).
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE (Advarsel)	Den procentvise fluorescensændring for denne prøve i forhold til prøverøret med den største fluorescensændring er lavere end den definerede grænse.
NO_BASELINE	Der er ikke fundet nogen første baseline. Den efterfølgende analyse kan ikke udføres.
RUN_FAILED	Analysen er indstillet til ugyldig pga. et problem med cyklusapparatet eller tilslutningen til cyklusapparatet.

Flag	Beskrivelse
RUN_STOPPED	Analysen er indstillet til ugyldig, fordi kørslen blev stoppet manuelt.
SATURATION	Rådatafluorescensen mættes kraftigt før amplifikationskurvens knæpunkt.
SPIKE	Spidser i rådatafluorescensen påvises i amplifikationskurven, men uden for det område, hvor C_T er fastlagt.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	En spids blev påvist i amplifikationskurven ved siden af C_T .
STEEP_BASELINE	En skarp stigning i baseline for rådatafluorescensen er påvist i amplifikationskurven.
STRONG_BASELINE_DIP	Et skarpt fald i baseline for rådatafluorescensen er påvist i amplifikationskurven.
STRONG_NOISE	Kraftig støj blev påvist uden for vækstfasen af amplifikationskurven.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Kraftig støj blev påvist i vækstfasen (eksponentiel) af amplifikationskurven.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	En bølgeformet baseline for rådatafluorescensen er påvist i amplifikationskurven.

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlsøgningsvejledning kan være en hjælp til at løse eventuelle problemer, der måtte opstå i forbindelse med vurderingen af *CALR*-mutationsstatus vha. *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet. Kontaktoplysninger findes på bagsiden eller på **www.qiagen.com**.

Se håndbøgerne til de respektive kits for oplysninger om fejlfinding i forbindelse med DSP QIAamp DNA Blood Mini-kit (kat.nr. 61104) eller QIAasymphony DNA DSP Mini-kit (kat.nr. 937236).

Se brugervejledningerne til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet og Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren for oplysninger om fejlfinding.

Kommentarer og forslag

En prøve påvises som positiv efter flere analyser

En given mutation kan påvises ved flere analyser

Det er f.eks. almindeligt, at en prøve med type 1-mutation amplificeres vha. CLAMP 1 og CLAMP 2-analyser ud over TYPE 1-analysen.

For en prøve med type 2-mutation er det almindeligt at opnå amplifikation med CLAMP 5-analyse foruden TYPE 2-analysen.

Ingen eller lav amplifikation af den intern amplifikationskontrol i eksterne kontroller og/eller prøver

- a) Reaktionsblanding og/eller *Taq* DNA-polymerase og/eller skabelon ikke tilføjet

Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontroller, at alle DNA-skabeloner og komponenter i qPCR-masterblandingen er blevet tilføjet. Gentag PCR-kørslen.

Kommentarer og forslag

- | | |
|--|---|
| b) Reaktionsblandingen er forringet | Opbevar kittets indhold ved -30 til -15 °C, og beskyt reaktionsblandingerne mod direkte lys.
Kontroller opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se etiketten), og brug evt. et nyt kit for at gentage PCR-kørslen. |
| c) Pipetteringsvolumenet kan være forkert | Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontroller, at der er tilsat 5 µl volumen kontrol/prøve og 20 µl volumen qPCR-masterblanding. Foretag en visuel kontrol af alle pipetterede volumener.
Kontroller og recalibrer pipetter, hvis det er nødvendigt, før gentagelse af qPCR-trinnene. |
| d) DNA-koncentrationen er for lav | Kontroller DNA-koncentrationen i prøven. <i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR-kittet er optimeret til en DNA-koncentration på 10 ng/µl. Hvis DNA-koncentrationen er mindre end 10 ng/µl, koncentrerer eller re-ekstraheres DNA fra helblod, hvilket reducerer elueringsvolumen, før qPCR-trinnet gentages. |
| e) Proteinkontaminering af DNA eller tilstedeværelse af organiske kemikalier | Kontroller A_{260}/A_{280} -forholdet. A_{260}/A_{280} -forholdet skal være $\geq 1,7$. Hvis forholdet er $< 1,7$, skal der udføres en ny DNA-ekstraktion, og PCR-kørsel skal gentages. |

Kommentarer og forslag

Tidlig amplifikation af den intern amplifikationskontrol i eksterne kontroller og/eller prøver

- | | |
|--|---|
| a) DNA-koncentrationen er for høj | Kontroller DNA-koncentrationen i prøven. <i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR-kittet er optimeret til en arbejdskoncentration på 10 ng/μl. Hvis DNA-koncentration er større end 10 ng/μl, skal DNA fortyndes i TE-buffer og PCR-kørsel gentages. |
| b) Pipetteringsvolumenet kan være forkert | Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontroller, at der er tilsat 5 μl volumen kontrol/prøve og 20 μl volumen qPCR-masterblanding. Foretag en visuel kontrol af alle pipetterede volumener.
Kontroller og recalibrer pipetter, hvis det er nødvendigt, før gentagelse af qPCR-trinnene. |
| c) Amplifikationskurven kan være ukorrekt. | Kontroller den tilsvarende amplifikation for usædvanlige kurver. Gentag PCR-kørslen. |

Ingen eller lave signaler for den interne amplifikationskontrol i prøver, men de eksterne kontroller er gyldige

- | | |
|-----------------------------------|--|
| a) DNA-koncentrationen er for lav | Kontroller DNA-koncentrationen i prøven. <i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR-kittet er optimeret til en DNA-koncentration på 10 ng/μl. Hvis DNA-koncentrationen er mindre end 10 ng/μl, koncentrerer eller re-ekstraheres DNA fra helblod, |
|-----------------------------------|--|

Kommentarer og forslag

hvilket reducerer elueringsvolumen, før qPCR-trinnet gentages.

- b) Proteinkontaminering af DNA eller tilstedeværelse af organiske kemikalier Kontroller A_{260}/A_{280} -forholdet. A_{260}/A_{280} -forholdet skal være $\geq 1,7$. Hvis forholdet er $< 1,7$, skal der udføres en ny DNA-ekstraktion, og PCR-kørsel skal gentages.
- c) Pipetteringsvolumenet kan være forkert Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontroller, at der er tilsat 5 μ l volumen kontrol/prøve og 20 μ l volumen qPCR-masterblanding. Foretag en visuel kontrol af alle pipetterede volumener.
Kontroller og recalibrer pipetter, hvis det er nødvendigt, før gentagelse af qPCR-trinnene.

Ingen skabelonkontrol (NTC/TE-buffer) er positiv (FAM og/eller HEX)

- a) Krydskontaminering eller kontaminering af reagenser Udskift alle vigtige reagenser, og gentag PCR-kørsel. Håndter altid prøver, kitkomponenter og forbrugsvarer iht. anbefalede fremgangsmåder for at forhindre afsmittende kontaminering.
Sørg for, at spidserne udskiftes mellem pipettering af forskellige reagenser og ved isætning af andre rør.
Klargør præ-PCR-masterblanding med dedikerede materialer (pipetter, spidser osv.)
Klargør præ-PCR-masterblandingen og NTC-reaktionen i et til formålet særligt område, hvor ingen DNA-matricer (DNA, plasmid eller PCR-produkter) introduceres.

Kommentarer og forslag

- Hvis det er muligt, skal PCR-rørene lukkes straks efter tilsætning af den prøve, der skal testes.
- b) Striprør og/eller prøve-id-inversion Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen.
- c) Reaktionsblandingen eller proben er forringet Opbevar kittets indhold ved -30 til -15 °C, og beskyt reaktionsblandingerne mod direkte lys.
Kontroller opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se etiketten), og brug evt. et nyt kit for at gentage PCR-kørslen.
- d) Amplifikationskurven kan være ukorrekt. Kontroller den tilsvarende amplifikation for usædvanlige kurver.
Gentag PCR-kørslen.

Ingen eller lav amplifikation af mutantkontrollen (MTC) (FAM-amplifikation)

- a) Reaktionsblanding og/eller *Taq* DNA-polymerase er ikke tilsat Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontroller, at alle komponenter i qPCR-masterblandingen er blevet tilsat. Gentag PCR-kørslen.
- b) Reaktionsblandingen er forringet Opbevar kittets indhold ved -30 til -15 °C, og beskyt reaktionsblandingerne mod direkte lys.
Kontroller opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se etiketten), og brug evt. et nyt kit for at gentage PCR-kørslen.

Kommentarer og forslag

- | | |
|---|---|
| c) Striprør og/eller prøve-id-inversion | Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen. |
| d) Pipetteringsvolumenet kan være forkert | Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontroller, at der er tilsat 5 µl volumen kontrol/prøve og 20 µl volumen qPCR-masterblanding. Foretag en visuel kontrol af alle pipetterede volumener.
Kontroller og recalibrer pipetter, hvis det er nødvendigt, før gentagelse af qPCR-trinnene. |

Tidlig amplifikation af mutantkontrollen (MTC) (FAM-amplifikation)

- | | |
|--|---|
| a) Pipetteringsvolumen kan være forkert. | Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontroller, at der er tilsat 5 µl volumen kontrol/prøve og 20 µl volumen qPCR-masterblanding. Foretag en visuel kontrol af alle pipetterede volumener.
Kontroller og recalibrer pipetter, hvis det er nødvendigt, før gentagelse af qPCR-trinnene. |
| b) Amplifikationskurven kan være ukorrekt. | Kontroller den tilsvarende amplifikation for usædvanlige kurver. Gentag PCR-kørslen. |
| c) Striprør og/eller prøve-id-inversion | Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen. |

Kommentarer og forslag

Tidlig amplifikation af vildtypekontrollen (WTC) (FAM-amplifikation)

- | | |
|--|---|
| a) Reaktionsblandingen er forringet | Opbevar kittets indhold ved -30 til -15 °C, og beskyt reaktionsblandingerne mod direkte lys.
Kontroller opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se etiketten), og brug evt. et nyt kit for at gentage PCR-kørslen. |
| b) Pipetteringsvolumenet kan være forkert | Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontroller, at der er tilsat 5 µl volumen kontrol/prøve og 20 µl volumen qPCR-masterblanding. Foretag en visuel kontrol af alle pipetterede volumener.
Kontroller og recalibrer pipetter, hvis det er nødvendigt, før gentagelse af qPCR-trinnene. |
| c) Striprør og/eller prøve-id-inversion | Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen. |
| d) Amplifikationskurven kan være ukorrekt. | Kontroller den tilsvarende amplifikation for usædvanlige kurver.
Gentag PCR-kørslen. |

Kommentarer og forslag

- e) Overført kontaminering Udskift alle kritiske reagenser.
Gentag eksperimentet med nye portioner af alle reagenser.
Hånder altid prøver, kitkomponenter og forbrugsvarer iht. anbefalede fremgangsmåder for at forhindre afsmittende kontaminering.
Sørg for, at spidserne udskiftes mellem pipettering af forskellige reagenser.

Tidlig amplifikation af vildtypekontrol (WTC) (FAM-amplifikation) samt ingen eller lav amplifikation af mutantkontrol (MTC) (FAM-amplifikation)

- a) Krydskontaminering Kontroller pipetteringsplanen og reaktionsopsætningen, og gentag PCR-kørslen.
- b) Inversion af reaktionsblandingerne i rørene eller forblanding Kontroller pipetteringsplanen og reaktionsopsætningen, og gentag PCR-kørslen.
- c) Striprør og/eller prøve-id-inversion Kontroller pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen.

Kommentarer og forslag

Hyppig fejl i vildtypekontrol (WTC) pga. høj baggrundsamplifikation under analysens gyldighedsmål (Ct)

Fejl i Rotor-Gene Q MDx-instrument

Kontroller instrumentets vedligeholdelseslog. Eksempelvis kan linseskævhed medføre højere baggrund. Hvis linsejustering ikke indgår i din vedligeholdelsesplan, bedes du kontakte QIAGENs tekniske serviceafdeling for yderligere information og eventuel indgriben.

Funktionsfejl pga. uregelmæssigt fluorescenssignal i kontrol og/eller prøver (i alle rør)

Fejl i Rotor-Gene Q MDx-instrumenttilbehør

Kontroller instrumentets vedligeholdelseslog. 72-brøndsroteren kan være fejlbehæftet.

Hvis et problem ikke kan tilskrives nogen af de årsager, der er angivet i "Troubleshooting guide" (fejlfinding), eller hvis den foreslåede afhjælpning ikke løser et problem, bedes du kontakte QIAGEN teknisk service for rådgivning.

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

Der er udført kvalitetskontrol af hele kittet på et Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Dette kit er fremstillet iht. ISO 13485-standarden. Analysecertifikater er tilgængelig ved anmodning på www.qiagen.com/support.

Begrænsninger

Kittet er beregnet til professionel brug.

Produktet må kun bruges af personale med særlig kompetence og uddannelse inden for molekylærbiologiske teknikker og kendskab til denne teknologi.

Dette kit skal bruges iht. instruktionerne i denne vejledning sammen med et valideret instrument, som angivet i "Nødvendige materialer, som ikke medfølger" side 15.

Alle reagenser, der leveres med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme kit. Dette kan påvirke ydeevnen.

Bemærk nøje udløbsdatoerne, der er trykt på æsken. Brug ikke komponenter, der er for gamle.

ipsogen CALR RGQ PCR-kittet er kun valideret til helblod, som er antikoaguleret i 2K EDTA.

ipsogen CALR RGQ PCR-kittet er kun godkendt til brug med QIASymphony DNA DSP Mini-kittet (kat.nr. 937236) eller QIAamp DSP DNA Blood Mini-kittet (kat.nr. 61104).

Kun Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (til PCR) og QIAAsymphony SP (til prøveklargøring) er valideret.

Enhver brug til andre formål end de tiltænkte af dette produkt og/eller komponentændringer gør, at QIAGENs garanti bortfalder.

De fremkomne diagnostiske resultater skal fortolkes i forbindelse med andre kliniske fund eller laboratoriefund. Hvis *CALR*-status af prøven er "No Mutation Detected", gælder dette kun fraværet af én af de 36 mutationer beskrevet i denne vejledning (se Table 1) – inden for rammerne af kittets følsomhed – eller den manglende påvisning af mutationerne type 23 og type 27 (se "ydelseskarakteristik/specifitet" på side 68). Dette udelukker ikke tilstedeværelsen af andre *CALR*-mutationer.

Det er brugerens ansvar at kontrollere systemets egnethed til eventuelle procedurer, der udføres i laboratoriet og ikke er omfattet af QIAGENs ydelsesundersøgelser.

Ydelseskarakteristik

Tomgrænse

Tomværdigrænsen (LOB) blev bestemt i henhold til standarden CLSI/NCCLS EP-17-A2 (8) med blodprøver fra en rask donor og en vildtype-CALR-status (der blev anvendt 5 prøver, 60 målinger pr. reagens-lot, 2 *ipsogen* CALR RGQ PCR-kit-lot). LOB blev bestemt ved hver given analyse som den lavest opnåede LOB-værdi.

LOB-resultaterne er opsummeret i tabel 5.

Tabel 5. Resumé af *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittets grænse for tomme resultater

CALR-analyse	Tomgrænse (C _T FAM-værdier)
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

Påvisningsgrænse

Påvisningsgrænsen (LOD) er bestemt ud fra “Probit-tilgangen”, der er beskrevet i standarden CLSI/NCCLS EP-17-A2 (8). I denne undersøgelse blev 5 lavmutationsniveauer analyseret for 3 uafhængige prøver (gDNA ekstraheret fra en CALR-mutationspositiv patient blandet med

vildtype-DNA). I alt 20 replikater pr. fortynding pr. positiv prøve blev udført for TYPE 1- og TYPE 2-analyserne med 2 lot fra *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet.

LOD blev bestemt ved en given analyse som den højeste LOD-værdi af de to analyserede lot. Resultaterne viste, at den analytiske følsomhed for type 1-CALR-mutation er 0,60 % og analytisk følsomhed for type 2-CALR-mutation er 0,08 % (tabel 6).

Tabel 6. Resumé af *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittets påvisningsgrænseresultater

CALR-analyse	Påvisningsgrænse
TYPE 1	0,60%
TYPE 2	0,08%

DNA-input

Det optimerede gDNA-input skal anvendes i kombination med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet blev evalueret med et lot på 3 CALR-positive prøver (plasmider blandet med vildtype-gDNA) og en gDNA CALR-negativ prøve for 5 forskellige gDNA-indgange. I denne undersøgelse blev der udført 3 replikater pr. inputprøve pr. CALR-analyse. Resultaterne viste, at det optimerede input, der skal anvendes, er 50 ng (10 ng/ μ l).

Repeterbarhed og reproducerbarhed

Præcisionsstudiet blev udført i overensstemmelse med standarden CLSI/NCCLS EP5-A2 (9). For hver CALR-analyse blev præcisionen vurderet på en given CALR-mutation, dvs. type 1 til TYPE 1-, CLAMP 1- og CLAMP 2-analyserne, type 2 til TYPE 2- og CLAMP 5-analyserne og type 28 til CLAMP 3 og CLAMP 4-analyserne. Undersøgelsen blev udført på 3 mutationsniveauer: 5 %, 25 % og 50 % (plasmider blandet med vildtype-gDNA). Hvert niveau blev testet vha. dobbeltbestemmelse med 49 kørsler over 20 dage med min. 73 målinger pr. mutationsniveau og pr. analyse. De tre prøver viste en variationskoefficient for den totale præcision (CV_{Total}) under 5 % for størstedelen af analyserne (tabel 7).

Bemærk: For CLAMP-analyserne kan den totale præcision variere mellem CALR-mutanter.

Tabel 7. Repeterbarheds- og reproducerbarhedsresultater for *ipsogen* CALR RGQ PCR-kitter

CALR-analyse	Mutationsniveau	Antal målinger	Sr*	Srr†	Total‡	CV _{Total} §
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: Repeterbarhed, udtrykt som standardafvigelsen.

† Srr: Mellem kørselsreproducerbarhed, udtrykt som standardafvigelsen.

‡ Total præcision (mellem instrumenter, operatører og lots, udtrykt som standardafvigelsen).

§ Variationskoefficienten for fuldstændig præcision.

Interfererende stoffer

Undersøgelsens design er baseret på anbefalingerne i NCCLS-standarden EP07-A2 (10). I alt 17 stoffer, som kan forefindes i blodprøverne, blev valgt pga. deres potentielle virkning på PCR: busulfan, citalopramhydrobromid, paroxetin-hydrokloridhemihydrat, sertralinhydroklorid, fluoxetinhydroklorid, acetaminofen [paracetamol], ukonjugeret bilirubin, kalium EDTA, hæmoglobin [humant], triglycerider, lisinoprildehydrat, hydroxyurea, acetylsalicylsyre, salicylsyre, thiotepa, anagrelid, interferon alfa 2b. Derudover blev den potentielle virkning af et stof, der blev anvendt under gDNA-ekstraheringsprocessen, proteinase K, ligeledes vurderet.

Resultaterne viste, at ingen af disse stoffer har en forstyrrende effekt.

Specificitet

Specificiteten af *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet blev evalueret ved at teste muligheden for at bestemme type 1- og type 2-mutationer korrekt, samt at påvise mutationerne beskrevet i Table 1.

For type 1- og type 2-mutationer blev undersøgelsen udført på gDNA-prøver ekstraheret fra helblod fra MPN Ph-patienter ved koncentrationer på $\geq 16\%$ mutation for type 1 og $\geq 9\%$ mutation for type 2. Specificiteten for type 1 og type 2 blev bekræftet: Alle prøver blev påvist og bestemt korrekt.

Specificiteten for type 3- til type 36-mutationer blev testet vha. gDNA-prøver ekstraheret fra helblod fra MPN Ph-patienter, hvor det var muligt (dvs. for type 3, 4, 5, 24, 25, 27, 29). For hver sjælden mutation, hvor det ikke har været muligt at tage en patientprøve, blev specificiteten vurderet vha. et syntetisk materiale bestående af menneskelig vildtype-gDNA blandet med plasmid-DNA, der bærer en kendt CALR-mutation, ved klinisk relevante koncentrationer $>10\%$ mutation (gennemsnitskoncentrationen er ca. 30% mutation).

Resultaterne viste, at alle *CALR*-mutationer fra type 3 til type 10, som er de hyppigst observerede, påvises af mindst én analyse foretaget af *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet. Størstedelen af *CALR*-mutationerne fra type 11 til 36 (0,3%) er påvist af mindst én analyse foretaget af *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet. Kun type 23 og 27 påvises ikke af kittet, mens type 22, 25, 26, 29 og 30 kun kan påvises i prøver med høj allel byrde for *CALR*.

Vigtig bemærkning: Specificitetsundersøgelsen viste, at type 5- og type 17-mutationer påvises af TYPE 1-analysen. TYPE 2-analysen muliggør amplifikation af type 10-, type 31- og type 33-36-mutationer. Dette var forventet pga. den høje sekvenslighed mellem disse *CALR*-mutationstyper (se Table 1), på nær type 17. Derfor er *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet ikke i stand til at skelne mellem type 1- og type 5/17-mutationer, ligeledes mellem type 2- og type 10/31/33-36-mutationer. Det er i øjeblikket ikke nødvendigt at differentiere hver *CALR*-mutation hvad angår diagnosticering eller behandling, da de fleste *CALR*-mutationer fører til dannelse af lignende *CALR*-mutantproteiner.

Klinisk validering og metodesammenligning

Formålet med denne undersøgelse var at validere *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet ved normal anvendelse. Undersøgelsen vurderede kittets evne til at bestemme type 1- og type 2-*CALR*-mutationer i en prøvekohorte bestående af patienter mistænkt for at have MPN. Denne valideringsundersøgelse blev udført på gDNA-prøver ekstraheret fra 227 patienter mistænkt for at have MPN, herunder *CALR*-positive og -negative prøver.

CALR-status på gDNA-referenceprøver foretaget med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet blev sammenlignet med *CALR*-statussen fra en selvstændig mutationspåvisning baseret på en fragmentstørrelsesanalyse kombineret med Sanger-tovejssekventering. Ved afvigende resultater blev en tredje mutationspåvisningsmetode anvendt: next generation sequencing (NGS).

CALR-status for alle prøver, der indgår i denne undersøgelse, og som bestemmes af referencemetoderne, er anført i tabel 8. Prøvekohorten består af 54,6 % positive prøver og

45,4 % negative prøver. Blandt de positive prøver blev 42,7 % karakteriseret som type 1 og 33,1 % som type 2 vha. referencemetoderne. Disse proportioner er i overensstemmelse med dem, der er beskrevet i Klampfl et al. (5), dvs. 53% for type 1 og 31,7% for type 2 (se Table 1).

Tabel 8. CALR-mutationsstatus for den samlede kohorte bestemmes vha. referencemetoder: fragmentstørrelsesanalyse, Sanger-tovejssekventering og NGS-analyse

CALR-status	Antal
Type 1-mutation	53
Type 2-mutation	41
Type 1 og Type 2	1
Andre CALR-mutationer	29
CALR-mutationpositiv	124 (54,6%)
CALR-mutationnegativ	103 (45,4%)
Prøver i alt	227

Alle kohorteprøver med CALR-mutationsstatus type 1 og/eller type 2 blev korrekt identificeret med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet. En type 1-mutation blev fejlagtigt tildelt af *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet til to prøver: én prøve karakteriseret som type 5-mutation af referencemetoder og eé prøve karakteriseret som en mutation, der ikke er beskrevet i Klampfl et al. (5). Ligeledes blev en type 2-mutation fejlagtigt tildelt én prøve, der via referencemetoder blev karakteriseret som en mutation, der ikke er beskrevet i Klampfl et al. (5). *In silico*-analysen viste, at disse afvigende prøver sandsynligvis skyldes høj sekvenslighed mellem disse mutationer og type 1- eller type 2-mutationer.

Den samlede overensstemmelse mellem resultaterne for type 1- og type 2-mutationer kombineret med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet og med fragmentstørrelsesanalyse/Sanger-sekventering/NGS er 98,7% (konfidensinterval [96,2%; 99,5%]). Følsomheden og specificiteten af *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet for type 1- og type 2-CALR-mutationer er tilsammen 100% (konfidensinterval [96,2%; 100%]) og 97,7% [93,5%; 99,5%]) (tabel 9).

Tabel 9. Resumé af resultatet for type 1- og type 2-CALR-mutationer kombineret

Variabel	Skøn	95 % konfidensinterval
Samlet overensstemmelse	98,7%	(96,2% ; 99,7%).
Følsomhed	100%	(96,2% ; 100%).
Specificitet	97,7%	(93,5% ; 99,5%).

Litteraturhenvisninger

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 (tidligere 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 (tidligere 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 (tidligere NCCLS).

Symboler

Følgende symboler kan evt. findes på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
	Katalognummer
	Producent
	Materialenummer
Rn	R står for revision af håndbogen og n er revisionsnummeret
	Lot-nummer
	Globalt handelsvarenummer
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik

Symbol	Symboldefinition
	CE-mærket efter europæisk standard
	Anvendes inden
 <N>	Indeholder tilstrækkeligt med reagenser til N reaktioner
	Temperaturbegrænsning
	Se de informationer, der er angivet i håndbogen
	Opbevares uden for sollys

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
<i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit (24)	Til 24 reaktioner: CALR Wild-type Control (vildtype-kontrol), CALR Mutant Control (mutantkontrol), CALR TYPE 1 Reaction Mix (reaktionsblanding), CALR TYPE 2 Reaction Mix (reaktionsblanding), CALR CLAMP 1 Reaction Mix(reaktionsblanding), CALR CLAMP 2 Reaction Mix(reaktionsblanding), CALR CLAMP 3 Reaction Mix(reaktionsblanding), CALR CLAMP 4 Reaction Mix(reaktionsblanding), CALR CLAMP 5 Reaction Mix(reaktionsblanding), Taq DNA-polymerase, TE-buffer til fortynding og NTC	674023
Rotor-Gene Q MDx og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cykusanordning og HRM-analyseapparat med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, lilla) samt HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: Inkluderer 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter. Installation og uddannelse er ikke inkluderet	9002032

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cykusanordning og HRM-analyseapparat med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, lilla) samt HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: Inkluderer 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter, installation og uddannelse	9002033
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette i 72 x 0,1-ml rør	9018901
72-Well Rotor	Til at holde Strip Tubes (striprør) og Caps (hætter) 0,1 ml; kræver Locking Ring 72-Well Rotor (72-brønds rotor med låsering)	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Til at låse Strip Tubes (striprør) og Caps (hætter), 0,1 ml i 72-Well Rotor (72-brønds rotor)	9018904
Rotor Holder	Fritstående metalholder til samling af rør og Rotor-Discs® i rotor	9018908
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 strips a 4 rør og hætter til 1.000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 strips a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner	981106
QIASymphony SP og tilbehør		
QIASymphony SP System	QIASymphony-prøveklargøringsmodul: inklusive installation og uddannelse, 1 års	9001751

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
	garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter	
QIASymphony SP	QIASymphony-prøveklargøringsmodul: inkluderer 1 års garanti på reservedele og arbejds løn	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-brønds-prøveklargøringsbeholdere til brug med QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-stangstildækninger til brug sammen med QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Engangsfilterspidser i rack (8 x 128). Til brug med QIAcube®- og QIASymphony SP/AS-instrumenterne	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Engangsfilterspidser i rack (8 x 128). Til brug sammen med QIASymphony SP/AS-instrumenter	997024
Tube Insert 3b, 2 ml, v2, prøveholder, Qsym	Sekundær røradapter (til 2 ml rør med skruehætter), til brug sammen med QIASymphony rørholder	9242083
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Usterile polypropylenrør (0,85 ml maksimumkapacitet, under 0,7 ml opbevaringskapacitet, 0,4 ml elueringskapacitet); 2304 i racks a 96; inkluderer hæftestrips	19588

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
Relaterede produkter		
QIAamp DNA DSP Blood Mini Kit (50)	Til 50 klargøringer: QIAamp Mini Spin-kolonner, buffere, reagenser, rør, VacConnectors	61104
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Til 192 klargøringer a 200 µl: Indeholder 2 reagensbeholdere og enzymracks samt tilbehør.	937236
RNase A (17.500 U)	2,5 ml (100 mg/ml, 7000 enheder/ml, opløsning)	19101

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller -brugermanual. QIAGEN kit-håndbøger og -brugermanualer kan fås via www.qiagen.com eller kan rekvireres hos QIAGENs tekniske service eller den lokale distributør.

Denne side skal være tom

Dette produkt er beregnet til in vitro-diagnostisk brug. QIAGEN-produkter må ikke videresælges, ændres til videresalg eller bruges til fremstilling af kommercielle produkter uden skriftlig tilladelse fra QIAGEN.

Oplysningerne i dette dokument kan ændres uden forudgående varsel. QIAGEN påtager sig intet ansvar for fejl, som kan findes i dette dokument. Dette dokument anses for at være fuldstændigt og nøjagtigt på tidspunktet for udgivelsen. QIAGEN er under ingen omstændigheder ansvarlig for tilfældige, særlige og adskillelige skader eller følgeskader, som opstår i forbindelse med eller stammer fra brugen af dette produkt.

QIAGEN-produkter er garanteret at leve op til de specifikationer, der er angivet for dem. QIAGEN er udelukkende forpligtet til, og kunden kan kun kræve, afhjælpning i form af udskiftning af produkter vederlagsfrit i tilfælde af, at produkter ikke fungerer som garanteret.

CALR-mutation og brugere heraf er beskyttet af patentrettigheder, herunder europæisk patent EP2808338 og udenlandske modparter. Købet af dette produkt overdrager ingen rettigheder til dets brug til kliniske forsøg for CALR-måletruede lægemidler. QIAGEN udvikler specifikke licensprogrammer til sådan brug. Kontakt QIAGEN Corporate Business Development på bd@qiagen.com.

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

Aftale om begrænset licens til *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med denne Instructions for Use (brugsanvisning) (håndbog) og kun med de komponenter, der er i kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i denne Instructions for Use (brugsanvisning) (håndbog) og yderligere protokoller, som fås på www.qiagen.com.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomskostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med *ipsogen* CALR RGQ PCR-kittet og/eller komponenterne deri.

For opdaterede licensbetingelser henvises til www.qiagen.com.

HB-2198-002 1103549 157025473 04-2017

© 2016-2017 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

