

Manuale del kit *ipsogen*[®] JAK2 *MutaQuant*[®]

 12 (catalogo n° 673522)

 24 (catalogo n° 673523)

Versione 1

IVD

Diagnostica quantitativa in vitro

Da utilizzare con gli strumenti Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®]
7900HT SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System
e LightCycler[®]



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R3

MAT

1072501IT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN è il leader mondiale nelle tecnologie per campioni e analisi destinate all'isolamento e alla rilevazione del contenuto di qualsiasi campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

QIAGEN definisce gli standard:

- nella purificazione del DNA, RNA e delle proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca sul microRNA e sull'RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per ulteriori informazioni, visitare il sito **www.qiagen.com**.

Indice

Uso previsto	4
Sommario e spiegazioni	4
Principio della procedura	7
Materiali in dotazione	10
Contenuto del kit	10
Materiali necessari ma non in dotazione	11
Avvertenze e precauzioni	12
Precauzioni generali	12
Conservazione e manipolazione dei reagenti	13
Procedura	15
Preparazione del DNA dei campioni	15
Protocolli	
■ qPCR su strumenti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o Rotor-Gene Q 5plex HRM con rotore a 72 provette	16
■ qPCR su ABI PRISM 7900HT SDS, sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR e strumento LightCycler 480	21
■ qPCR su strumento LightCycler 1.2	28
Interpretazione dei risultati	33
Guida alla risoluzione dei problemi	37
Controllo qualità	41
Limiti della metodica	41
Caratteristiche delle prestazioni	41
Studi non clinici	41
Studi clinici	43
Bibliografia	45
Simboli	46
Informazioni sui contatti	46
Informazioni per gli ordini	47

Uso previsto

Il kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* è un test quantitativo in vitro per la rilevazione e quantificazione accurate dell'allele JAK2 V617F/G1849T a partire da DNA genomico estratto da sangue periferico di pazienti con sospetta neoplasia mieloproliferativa (MPN).

L'assenza della mutazione JAK2 V617F/G1849T non esclude la presenza di altre mutazioni JAK2. Il test può infatti dare risultati di falso negativo qualora siano presenti mutazioni aggiuntive nei nucleotidi da 88504 a 88622 (1).

Nota: Il kit deve essere impiegato seguendo le istruzioni fornite nel presente manuale e utilizzando reagenti e strumenti approvati. Qualsiasi impiego non previsto del prodotto e/o alterazione dei componenti esenteranno QIAGEN da qualsiasi responsabilità.

Sommario e spiegazioni

Una mutazione somatica ricorrente, V617F, del gene della tirosina Janus chinasi 2 (JAK2), è stata identificata nel 2005 (2–5), determinando un importantissimo passo avanti nella comprensione, classificazione e diagnosi della neoplasia mieloproliferativa (MPN). JAK2 è un'importante molecola di segnalazione intracellulare per numerose citochine, tra cui l'eritropoietina.

La mutazione JAK2 V617F è stata individuata in >95% dei pazienti con policitemia vera (PV), nel 50–60% dei pazienti con trombocitemia essenziale (ET) e nel 50% dei pazienti con mielofibrosi primaria (PMF). JAK2 V617F è stata inoltre individuata in alcuni rari casi di leucemia mielomonocitica cronica, nella sindrome mielodisplasica, nella mastocitosi sistemica e nella leucemia neutrofila cronica, ma nello 0% dei pazienti con leucemia mieloide cronica (CML) (6).

La mutazione corrisponde alla modifica di un unico nucleotide 1849 di JAK2 nell'esone 14: ciò provoca la sostituzione di una valina (V) con una fenilalanina (F) alla posizione 617 della proteina (dominio JH2). Ciò porta all'attivazione costitutiva di JAK2, alla trasformazione ematopoietica in vitro e alla crescita di colonie eritrocitarie senza aggiunta di eritropoietina (EEC) in tutti i pazienti con PV e un'estesa percentuale di pazienti con ET e PMF (7). JAK2 V617F rappresenta un fattore fondamentale nell'induzione della trasformazione di cellule ematopoietiche nella MPN, ma gli esatti meccanismi patologici che determinano, con la stessa unica mutazione, tali diverse entità cliniche e biologiche devono ancora essere completamente chiariti.

La diagnosi di MPN si basava tradizionalmente su criteri clinici, sull'esame istologico del midollo osseo e su criteri citogenetici. La scoperta di un marcatore molecolare specifico della malattia ha prodotto sia una semplificazione della procedura sia una maggiore accuratezza diagnostica. Il rilevamento della mutazione JAK2 V617F fa ora parte dei criteri di riferimento OMS 2008 per la

diagnosi di casi MPN negativi per BCR-ABL (Tabella 1) e la presenza di questa mutazione è un importante criterio di conferma diagnostica.

Tabella 1. Criteri diagnostici per MPN secondo OMS (adattati da rif. 8)

Criteri diagnostici per policitemia vera (PV)	
Maggiori	1. Emoglobina (Hgb) $>18,5$ g/dl ⁻¹ (uomini) o $>16,5$ g/dl ⁻¹ (donne), oppure Hgb o ematocrito (Hct) $>99^{\circ}$ percentile dell'intervallo di riferimento per età, sesso o altitudine di residenza, oppure Hgb >17 g/dl ⁻¹ (uomini) o >15 g/dl ⁻¹ (donne) se associata a un sostanziale aumento ≥ 2 g/dl ⁻¹ dal basale non attribuibile a correzione di carenza di ferro, oppure Aumento della massa eritrocitaria $>25\%$ rispetto al valore medio normale previsto 2. Presenza di <i>JAK2V617F</i> o di mutazione simile
Minori	1. Mieloproliferazione trilineare del midollo osseo 2. Livello di eritropoietina sierica inferiore alla norma 3. Crescita endogena di colonie eritrocitarie (EEC)
Criteri diagnostici per trombocitemia essenziale (ET)	
Maggiori	1. Trombociti $\geq 450 \times 10^9$ l ⁻¹ 2. Proliferazione megacariocitaria con forme grandi e mature. Proliferazione granulocitaria o eritrocitaria normale o minima. 3. Esclusione dei criteri diagnostici OMS di leucemia mieloide cronica (CML), PV, mielofibrosi primaria (PMF), sindrome mielodisplasica (MDS) o altre neoplasie mieloidi 4. Dimostrazione di <i>JAK2V617F</i> o altri marcatori clonali, oppure Nessuna evidenza di trombocitosi reattiva
Minori	-
Criteri diagnostici per mielofibrosi primaria (PMF)	
Maggiori	1. Proliferazione megacariocitaria con atipie, accompagnata da fibrosi reticolinica e/o collagena, oppure In assenza di fibrosi reticolinica, le alterazioni megacariocitarie devono essere accompagnate da un aumento della cellularità midollare, proliferazione granulocitaria e spesso diminuzione dell'eritropoiesi (vale a dire, PMF prefibrotica) 2. Esclusione dei criteri diagnostici OMS per (CML), PV, MDS o altre neoplasie mieloidi 3. Dimostrazione di <i>JAK2V617F</i> o altri marcatori clonali, oppure Nessuna evidenza di fibrosi midollare reattiva
Minori	1. Leucoeritroblastosi 2. Aumento della lattato-deidrogenasi sierica (LDH) 3. Anemia 4. Splenomegalia palpabile

Di recente, alcuni esperti internazionali hanno proposto criteri per la conduzione di sperimentazioni terapeutiche su PV ed ET. In base a dati relativi a

trapianto allogenico, interferone alfa o idrossiurea, la quantificazione di JAK2V617F è stata inclusa come strumento potenzialmente utile per il monitoraggio della risposta al trattamento (9). È stata osservata una riduzione del carico di JAK2 V617F in risposta ad alcuni dei nuovi farmaci mirati anti-JAK2 nello sviluppo clinico (10).

Principio della procedura

Per determinare quantitativamente la percentuale di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nei campioni di DNA sono state proposte diverse tecniche. Tra queste, si preferiscono i metodi basati sulla reazione quantitativa a catena della polimerasi (qPCR) real-time grazie alla loro maggiore sensibilità nel monitoraggio del carico allelico nell'intero processo. Molte di queste tecniche presentano una moderata sensibilità, ovvero tra l'1 e il 10%, ad esempio la discriminazione allelica TaqMan[®], la tecnologia di pirosequenziamento Pyrosequencing[®], l'analisi della curva di melting e il sequenziamento diretto. Alcune, ad esempio la curva di melting e il sequenziamento, sono unicamente semiquantitative, mentre altre, quale il pirosequenziamento, necessitano del processamento post-PCR o di apparecchiature non sempre disponibili, oppure presentano costi di installazione proibitivi per i test di laboratorio di routine. Un approccio ad elevata sensibilità (sensibilità <0,1%) prevede l'utilizzo di un primer SNP specifico, che consente l'amplificazione selettiva dell'allele mutante o wild-type, facilmente rilevabile da uno strumento di analisi della qPCR real-time. Il kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* si basa su questa tecnica.

L'uso di qPCR consente l'accurata quantificazione dei prodotti della PCR durante la fase esponenziale del processo di amplificazione della PCR. I dati della PCR quantitativa possono essere ottenuti rapidamente, senza ricorrere a trattamento post-PCR, rilevando in tempo reale i segnali di fluorescenza durante e/o dopo i cicli della PCR, riducendo così drasticamente il rischio di contaminazione del prodotto della PCR. Le tecniche della qPCR attualmente disponibili appartengono a 3 tipi principali: analisi qPCR tramite fluorocromo SYBR[®] Green I, analisi qPCR tramite sonde idrolitiche e analisi qPCR tramite sonde di ibridazione.

Il presente test si basa sul principio dell'idrolisi dell'oligonucleotide a doppio fluorocromo qPCR. Durante la PCR, i primer diretti e inversi ibridizzano secondo una sequenza specifica. La stessa miscela contiene un oligonucleotide a doppio fluorocromo. Questa sonda, costituita da un oligonucleotide le cui estremità sono marcate da due fluorocromi, un reporter all'estremità 5' e un quencher all'estremità 3', ibridizza sulla sequenza bersaglio nel prodotto della PCR. L'analisi in qPCR con sonde idrolitiche sfrutta l'attività di esonucleasi 5'→3' della DNA polimerasi del batterio *Thermus aquaticus* (*Taq*). Quando la sonda è intatta, il reporter e il quencher sono posizionati a una distanza tale da permettere al quencher di sopprimere la fluorescenza del reporter, fondamentalmente ad opera di un trasferimento di energia di tipo Förster.

Durante la PCR, se il bersaglio di interesse è presente, la sonda ibridizza specificamente i siti dei primer inversi e diretti. L'attività di esonucleasi 5'→3' della DNA polimerasi scinde la sonda tra il reporter e il quencher solo se la sonda ibridizza sul bersaglio. I frammenti della sonda vengono poi allontanati dal bersaglio, mentre la polimerizzazione del filamento continua. L'estremità 3' della sonda è bloccata al fine di prevenirne l'estensione durante la PCR (Figura 1). Questo processo si verifica a ogni ciclo e non interferisce con l'accumulo esponenziale di prodotto.

L'aumento del segnale di fluorescenza è rilevato solo se la sequenza bersaglio è complementare alla sonda e quindi amplificata durante la PCR. A causa di questi requisiti, l'amplificazione aspecifica non è rilevata. Pertanto l'aumento della fluorescenza è direttamente proporzionale all'amplificazione bersaglio durante la PCR.

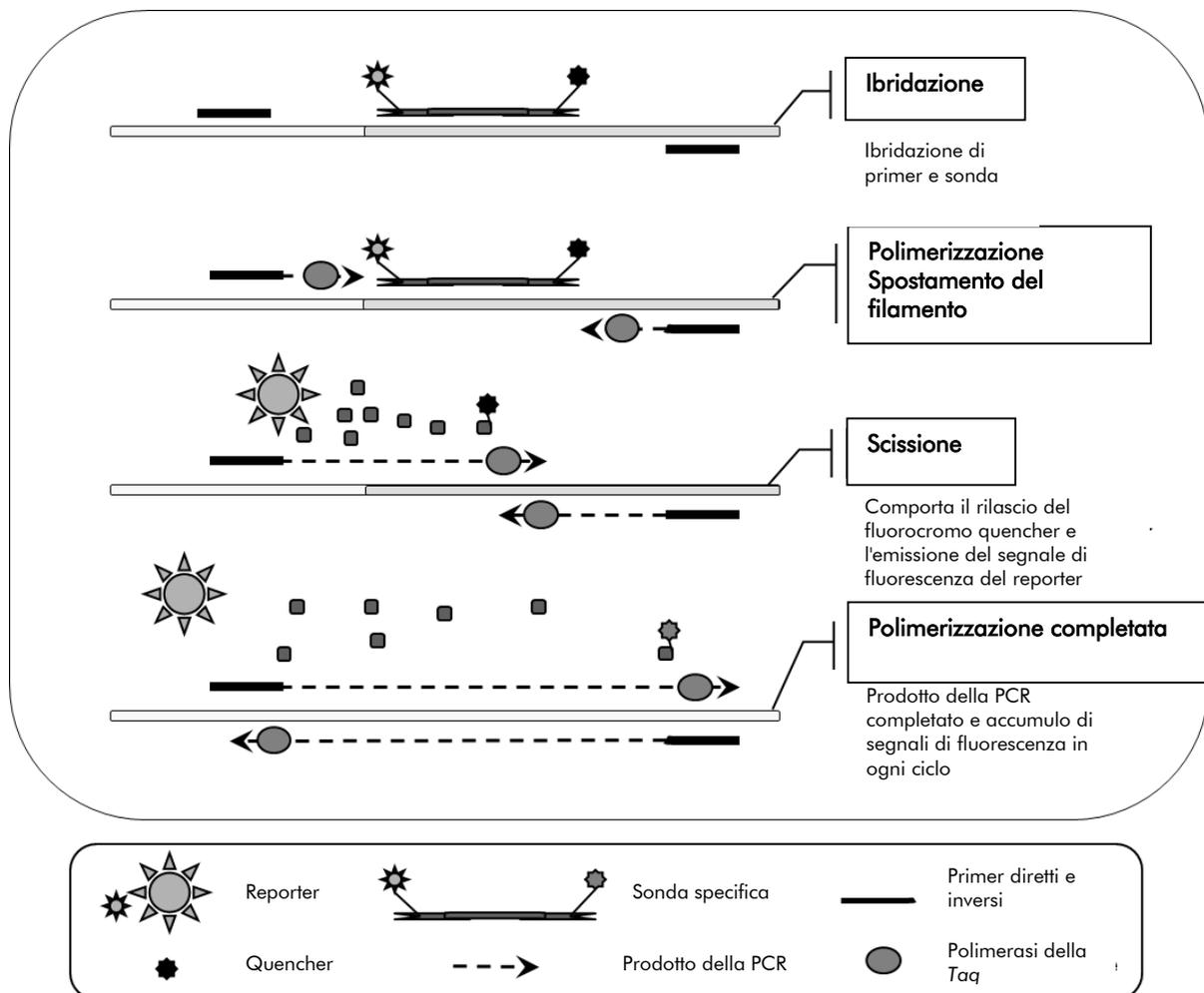


Figure 1. Principio della reazione.

La tecnologia quantitativa PCR allele-specifica utilizzata in questo kit del test consente una rilevazione sensibile ed accurata oltre che un'elevata riproducibilità nell'analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP). Questa

tecnica si basa sull'uso di specifici primer diretti, per il wild-type e per l'allele V617F (11). Nella PCR, l'estensione e l'amplificazione avvengono solo in caso di perfetta corrispondenza tra primer e DNA bersaglio (Figura 2).

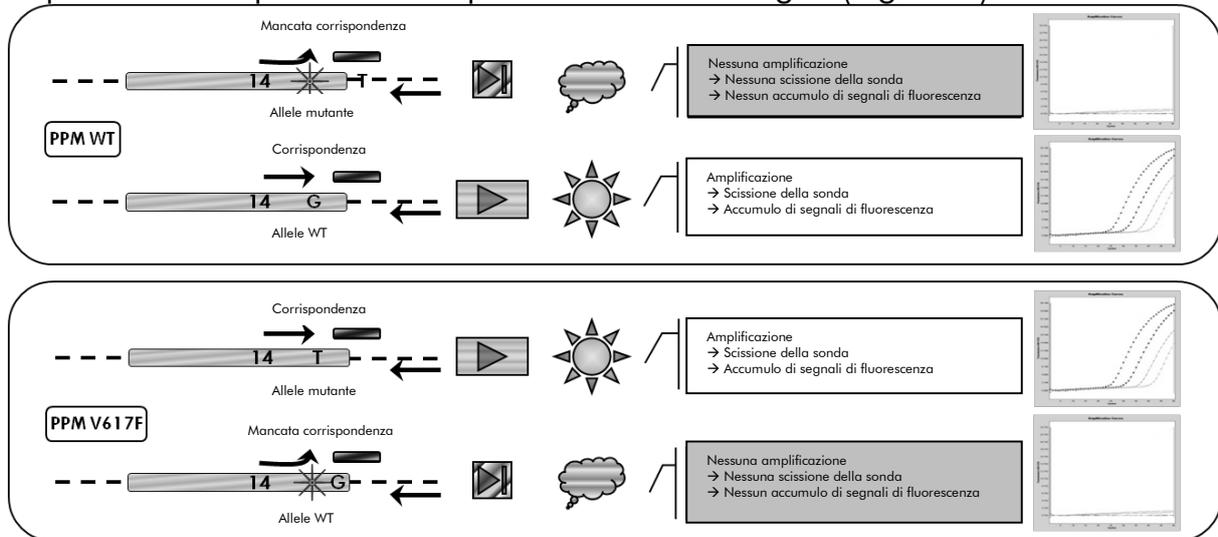


Figure 2. PCR allele-specifica. L'utilizzo della miscela di primer wild-type o V617F e sonda consente la rilevazione specifica dell'allele wild-type o mutato in due reazioni separate condotte utilizzando lo stesso campione. I risultati sono espressi come percentuale di copie VF tra tutte le copie JAK2.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Catalogo n°		673522	673523
Numero di reazioni		12	24
V617F positive control (controllo positivo V617F) (allele 100% V617F)	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (controllo negativo V617F) (allele 100% wild-type)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution (diluizione standard M1-VF), 50 copie (5 x 10 ¹ copie V617F/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution (diluizione standard M2-VF), 500 copie (5 x 10 ² copie V617F/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution (diluizione standard M3-VF), 5.000 copie (5 x 10 ³ copie V617F/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution (diluizione standard M4-VF), 50.000 copie (5 x 10 ⁴ copie V617F/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution (diluizione standard WT-1), 50 copie (5 x 10 ¹ copie wild-type/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution (diluizione standard WT-2), 500 copie (5 x 10 ² copie wild-type/5 µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl
WT-3 Standard Dilution (diluizione standard WT-3), 5.000 copie (5 x 10 ³ copie wild-type/5 µl)	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution (diluizione standard WT-4), 50.000 copie (5 x 10 ⁴ copie wild-type/5 µl)	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT* (miscela di primer e sonda JAK2 WT)	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl

* Miscela di primer inversi e diretti specifici per il gene di controllo JAK2 wild-type, più sonda FAM™-TAMRA™ specifica.

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Catalogo n°		673522	673523
Numero di reazioni		12	24
Primers and Probe Mix JAK2 V617F * (miscela di primer e sonda JAK2 V617F)	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 μ l	95 μ l
ipsogen JAK2 MutaQuant Kit Handbook (inglese)		1	1

* Miscela di primer inversi e diretti per la mutazione JAK2 V617F, più sonda specifica FAM-TAMRA.

Nota: Agitare su vortex e centrifugare brevemente le diluizioni standard e le miscele di primer e sonda prima dell'uso.

Materiali necessari ma non in dotazione

Durante l'uso di sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

Reagenti

- Acqua per PCR priva di nucleasi
- Tampone e Taq DNA polimerasi: I reagenti approvati sono TaqMan Universal PCR Master Mix (miscela master PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, cat. n° 4304437) e LightCycler TaqMan Master (miscela master PCR 5x) (Roche, cat. n° 04535286001) o LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe® (miscela master 5x) (Roche, cat. n° 03515567001)

Materiali di consumo

- Puntali per pipetta PCR sterili, resistenti alla contaminazione aerosol, privi di nucleasi, con filtri idrofobici
- Provette per PCR prive di nucleasi da 0,5 ml o 1,5 ml
- Ghiaccio

Attrezzatura

- Pipetta con graduazione in microlitri* specifica per PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Centrifuga da banco* con rotore per micropiastre e provette di reazione da 0,5 ml/1,5 ml (per centrifugazione fino a 13.000–14.000 giri/min)
- Strumentazione per PCR in tempo reale:* Rotor-Gene Q 5plex HRM® o altro Rotor-Gene; LightCycler 1.2 o 480; ABI PRISM 7900HT SDS; sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR; e materiale specifico associato
- Biofotometro

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Durante l'uso di sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo

www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

Smaltire i campioni e i residui dei test secondo le locali disposizioni in materia di sicurezza.

Precauzioni generali

Per utilizzare i test qPCR è necessario attenersi a buone pratiche di laboratorio, come la manutenzione dell'attrezzatura, appositamente dedicate alla biologia molecolare e conformi alle leggi vigenti e ai relativi standard.

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

Questo kit è destinato all'uso diagnostico in vitro. Le istruzioni e i reagenti forniti nel kit sono stati approvati per consentire prestazioni ottimali. L'ulteriore diluizione dei reagenti o l'alterazione dei tempi di incubazione e delle temperature potrebbe generare dati errati o discordanti. I reagenti PPM-WT e PPM-VF potrebbero alterarsi se esposti alla luce. Tutti i reagenti sono stati formulati per essere utilizzati specificamente con il presente test. Per garantire una prestazione ottimale del test si consiglia di non effettuare sostituzioni.

Utilizzare estrema cautela per evitare:

- Contaminazione da DNasi che potrebbe portare a degradazione del DNA stampo.
- Contaminazione crociata del DNA o della PCR con conseguente segnale falso-positivo.

Si consiglia quindi quanto segue.

- Utilizzare strumenti di laboratorio privi di nucleasi (ad es. pipette, puntali per pipetta, provette di reazione) e indossare i guanti durante l'esecuzione dell'analisi.
- Utilizzare puntali per pipetta resistenti alla contaminazione aerosol durante tutti i passaggi di pipettatura per evitare fenomeni di contaminazione crociata dei campioni e dei reagenti.
- Preparare la miscela master per PCR con materiali appositi (pipette, puntali, ecc.) in una zona dedicata, dove non siano presenti matrici di DNA (DNA, plasmidi o prodotti della PCR). Aggiungere il filamento stampo in una zona separata (preferibilmente in una stanza dedicata) utilizzando materiale specifico (pipette, puntali, ecc.).

Conservazione e manipolazione dei reagenti

I kit sono spediti in ghiaccio secco e devono essere conservati a una temperatura compresa tra -15°C e -30°C al momento della ricezione

- Minimizzare l'esposizione alla luce delle miscele di primer e sonda (provette PPM-WT e PPM-VF).
- Miscelare delicatamente e centrifugare le provette prima dell'apertura.
- Conservare tutti i componenti del kit nelle confezioni originali.

Le condizioni di conservazione indicate valgono sia per i componenti aperti sia per quelli non aperti. I componenti conservati in condizioni diverse da quelle indicate sulle etichette potrebbero non funzionare adeguatamente e inficiare i risultati del saggio.

Le date di scadenza dei reagenti sono indicate sulla rispettiva etichetta del componente. Se conservato correttamente, il prodotto mantiene inalterate le proprie prestazioni fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.

Il prodotto non fornisce segnali evidenti di instabilità. Si consiglia, tuttavia, di eseguire contemporaneamente controlli positivi e negativi con campioni non noti.

Procedura

Preparazione del DNA dei campioni

Il DNA genomico deve essere estratto da sangue intero, linfociti di sangue periferico purificato da sangue intero, cellule polinucleate o granulociti. Per ottenere risultati confrontabili, si raccomanda di utilizzare la stessa frazione cellulare e il medesimo metodo di estrazione del DNA e della frazione cellulare. L'estrazione del DNA può essere eseguita con un metodo del laboratorio o utilizzando un kit disponibile in commercio.

La quantità di DNA deve essere determinata misurando l'assorbanza (OD) del campione a 260 nm, mentre la qualità del DNA può essere valutata tramite spettrofotometria o elettroforesi su gel*.

- Il rapporto OD_{260}/OD_{280} deve essere 1,7–1,9; rapporti inferiori potrebbero indicare una contaminazione con sostanze proteiche o presenza di materiali chimici organici.
- Mediante elettroforesi su gel* di agarosio 0,8-1,0% sarà possibile visualizzare il DNA isolato sotto forma di banda distinta di circa 20 kb (un leggero effetto smear fornirà risultati accettabili).

Il DNA risultante deve essere diluito a una concentrazione di 5 ng/ μ l in tampone 1x TE* con pH 8,0 e conservato a una temperatura compresa tra +4°C e +8°C per 1 settimana o a -20°C se per un periodo maggiore.

La reazione qPCR è ottimizzata per campioni di DNA contenenti 25 ng di DNA genomico purificato.

* Durante l'uso di sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

Protocollo: qPCR su strumenti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o Rotor-Gene Q 5plex HRM con rotore a 72 provette

Se si utilizza uno di questi strumenti, si suggerisce di effettuare tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 2.

Tabella 2. Numero di reazioni per strumenti Rotor-Gene Q con rotore a 72 provette

Campioni	Reazioni
Con la miscela di primer e sonda JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 standard M-VF	8 reazioni, ognuna testata in duplicato
n campioni di DNA	n x 2 reazioni
2 controlli DNA	4 reazioni: controllo positivo (PC-VF) e controllo negativo (NC-VF), ognuno testato in duplicato
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni
Con la miscela di primer e sonda JAK2 wild-type (PPM-WT)	
4 standard wild-type	8 reazioni, ognuna testata in duplicato
n campioni di DNA	n x 2 reazioni
2 controlli DNA	4 reazioni: PC-VF e NC-VF, ognuna testata in duplicato
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni

Processazione dei campioni su strumenti Rotor-Gene Q con rotore a 72 provette

Per ottimizzare l'uso degli standard e delle miscele di primer e sonda, si consiglia di effettuare il test su almeno 8 campioni di DNA con il kit di 24 reazioni (catalogo n° 673523) e su almeno 6 campioni di DNA con il kit di 12 reazioni (catalogo n° 673522) nel corso dello stesso esperimento.

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

Le tabelle 3 e 4 mostrano lo schema di pipettatura per la preparazione di una miscela di reagente, calcolata per raggiungere un volume di reazione finale di 25 μ l. È possibile preparare una premiscela, a seconda del numero di reazioni, utilizzando la medesima miscela di primer e sonda (PPM-VF o PPM-WT). Sono inclusi volumi extra per compensare eventuali errori di pipettatura.

Tabella 3. Preparazione della miscela qPCR

Componente	1 reazione (μl)	Premiscela V617F 30 + 1 reazioni (μl)	Concentrazione finale
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Miscela di primer e sonda, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	201,5	–
Campione (da aggiungere alla fase 4)	5,0	5 ognuno	–
Volume totale	25,0	25 ognuno	–

Tabella 4. Preparazione della miscela qPCR

Componente	1 reazione (μl)	Premiscela WT 30 + 1 reazioni (μl)	Concentrazione finale
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Miscela di primer e sonda, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	201,5	–
Campione (da aggiungere alla fase 4)	5,0	5 ognuno	–
Volume totale	25,0	25 ognuno	–

- 3. Dispensare 20 μ l della premiscela qPCR (VF o WT) in ogni provetta.**
- 4. Aggiungere 5 μ l di materiale da quantificare (25 ng di DNA genomico campione o controllo) nella provetta corrispondente (volume totale 25 μ l).**
- 5. Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
- 6. Posizionare le provette nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.**
- 7. Programmare lo strumento Rotor-Gene Q con il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 5.**

Tabella 5. Profilo termico

Modalità di analisi	Quantificazione
Mantenimento	Temperatura: 50°C Durata: 2 minuti
Mantenimento 2	Temperatura: 95°C Durata: 10 minuti
Ciclizzazione	50 volte 95°C per 15 secondi 62°C per 1 minuto con acquisizione della fluorescenza FAM nel canale Green: singolo

- 8. Selezionare "Slope Correct" (correggi pendenza) per la fase di analisi su strumenti Rotor-Gene Q. Si consiglia di impostare la soglia a 0,03. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 5.**

Protocollo: qPCR su ABI PRISM 7900HT SDS, sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR e strumento LightCycler 480

In caso di utilizzo di un dispositivo qPCR a 96 pozzetti, si suggerisce di eseguire tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 6.

Tabella 6. Numero di reazioni utilizzando un dispositivo qPCR a 96 pozzetti

Campioni	Reazioni
Con la miscela di primer e sonda JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 standard M-VF	8 reazioni, ognuna testata in duplicato
n campioni di DNA	n x 2 reazioni
2 controlli DNA	4 reazioni: PC-VF e NC-VF, ognuna testata in duplicato
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni
Con la miscela di primer e sonda JAK2 wild-type (PPM-WT)	
4 standard wild-type	8 reazioni, ognuna testata in duplicato
n campioni di DNA	n x 2 reazioni
2 controlli DNA	4 reazioni: PC-VF e NC-VF, ognuna testata in duplicato
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni

Processazione di campioni su ABI PRISM 7900HT SDS, sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR e strumento LightCycler 480

Per ottimizzare l'uso degli standard e delle miscele di primer e sonda, si consiglia di effettuare il test su 8 campioni di DNA con il kit di 24 reazioni (catalogo n° 673523) e su almeno 6 campioni di DNA con il kit di 12 reazioni (catalogo n° 673522) nel corso dello stesso esperimento.

La configurazione della piastra nella Figura 4 mostra un esempio di questo esperimento con il kit di 24 reazioni (catalogo n° 673523), mentre la Figura 5 mostra l'esempio di un esperimento con il kit di 12 reazioni (catalogo n° 673522).

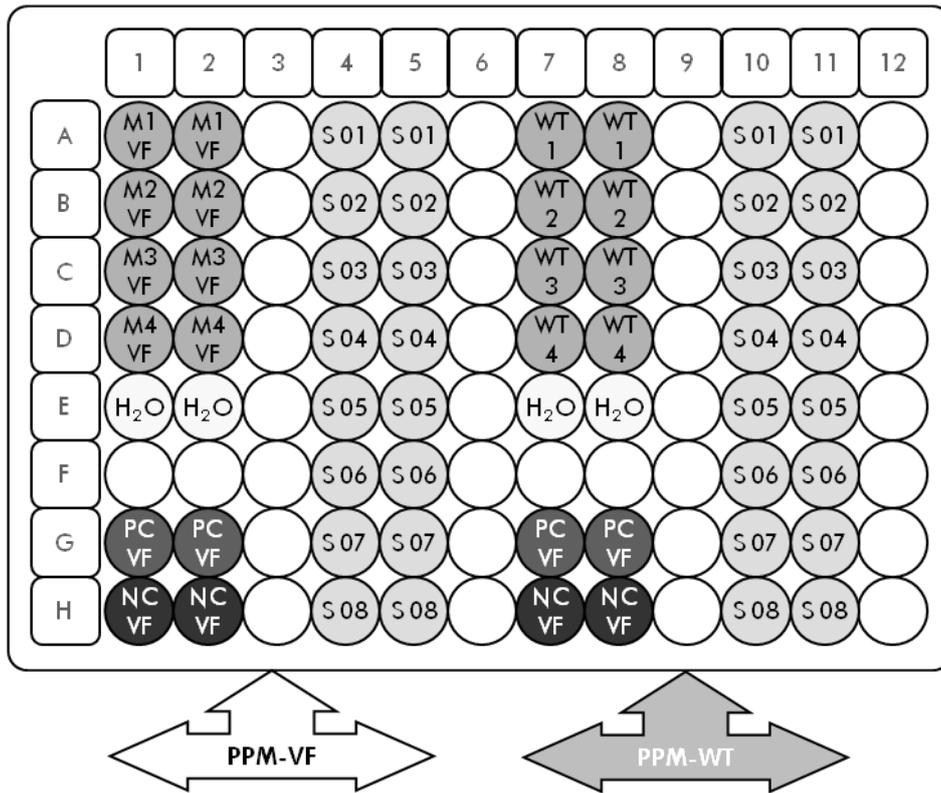


Figura 4. Configurazione consigliata della piastra per un esperimento con il kit di 24 reazioni (catalogo n° 673523). PC-VF: controllo positivo V617F; NC-VF: controllo negativo V617F; M-VF: standard V617F; M-WT: standard wild-type; S: campione di DNA; H₂O: acqua come materiale di controllo

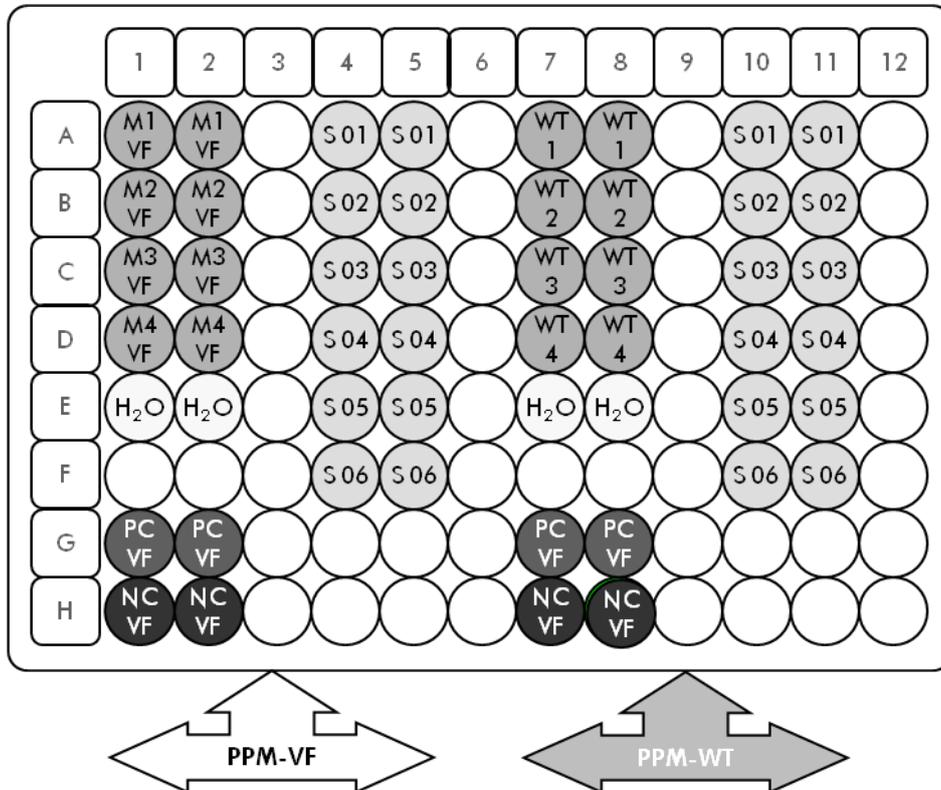


Figura 5. Configurazione consigliata della piastra per un esperimento con il kit di 12 reazioni (catalogo n° 673522). PC-VF: controllo positivo V617F; NC-VF: controllo negativo

V617F; **M-VF**: standard V617F; **M-WT**: standard wild-type; **S**: campione di DNA; **H₂O**: acqua come materiale di controllo

qPCR su ABI PRISM 7900HT SDS, sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR e strumento LightCycler 480

Nota: Eseguire tutte le fasi su ghiaccio.

Procedura

- 1. Scongela tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.**
- 2. Preparare la seguente miscela qPCR a seconda del numero di campioni da sottoporre a test.**

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

Le tabelle 7 e 8 mostrano lo schema di pipettatura per la preparazione di una miscela di reagente, calcolata per raggiungere un volume di reazione finale di 25 μ l. È possibile preparare una premiscela, a seconda del numero di reazioni, utilizzando la medesima miscela di primer e sonda (PPM-VF o PPM-WT). Sono inclusi volumi extra per compensare eventuali errori di pipettatura.

Tabella 7. Preparazione della miscela qPCR

Componente	Premiscela V617F			Concentrazione finale
	1 reazione (μ l)	26 + 1 reazioni (μ l)	30 + 1 reazioni (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Miscela di primer e sonda, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	175,5	201,5	–
Campione (da aggiungere alla fase 4)	5,0	5 ognuno	5 ognuno	–
Volume totale	25,0	25 ognuno	25 ognuno	–

Tabella 8. Preparazione della miscela qPCR

Componente	Premiscela WT			Concentrazione finale
	1 reazione (μ l)	26 + 1 reazioni (μ l)	30 + 1 reazioni (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Miscela di primer e sonda, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	175,5	201,5	–
Campione (da aggiungere alla fase 4)	5,0	5 ognuno	5 ognuno	–
Volume totale	25,0	25 ognuno	25 ognuno	–

3. Dispensare 20 μ l della premiscela qPCR (VF o WT) in ogni pozzetto.
4. Aggiungere 5 μ l di materiale da quantificare (25 ng di DNA genomico campione o controllo) nel pozzetto corrispondente (volume totale 25 μ l).
5. Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.
6. Chiudere la piastra e centrifugare brevemente (300 x g, circa 10 secondi).
7. Posizionare la piastra nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.
8. Programmare il termociclatore con il programma di ciclizzazione termica e impostare lo strumento per l'acquisizione della sonda a fluorescenza FAM a doppia marcatura, come indicato nella Tabella 9 per ABI PRISM 7900HT SDS e il sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, o nella Tabella 10 per lo strumento LightCycler 480.

Tabella 9. Profilo termico per ABI PRISM 7900HT SDS e il sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR

Modalità di analisi	Curva standard - Quantificazione assoluta
Mantenimento	Temperatura: 50°C Durata: 2 minuti
Mantenimento 2	Temperatura: 95°C Durata: 10 minuti
Ciclizzazione	50 volte 95°C per 15 secondi 63°C per 1 minuto e 30 secondi con acquisizione della fluorescenza FAM; quencher: TAMRA

Tabella 10. Profilo termico per lo strumento LightCycler 480

Modalità di analisi	Quantificazione assoluta ("Abs Quant")
Formati di rilevazione	Selezionare "Simple Probe" (sonda semplice) nella finestra dei formati di rilevazione
Mantenimento	Temperatura: 50°C Durata: 2 minuti
Mantenimento 2	Temperatura: 95°C Durata: 10 minuti
Ciclizzazione	50 volte 95°C per 15 secondi 63°C per 1 minuto e 30 secondi con acquisizione della fluorescenza FAM corrispondente a (483–533 nm) per la versione LC 01 e (465–510 nm) per la versione LC 02

- 9. Per l'ABI PRISM 7900HT e il sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, seguire la fase 8a. Per lo strumento LightCycler 480, seguire la fase 8b.**

- 9a. ABI PRISM 7900HT e sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR: si consiglia di impostare la soglia a 0,1. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 9.**
- 9b. LightCycler 480: si consiglia una modalità di analisi Fit point con rumore di fondo a 2,0 e soglia a 2,0. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 10.**

Protocollo: qPCR su strumento LightCycler 1.2

Se si utilizzano strumenti a capillari, si suggerisce di misurare i campioni in duplicato e i controlli una sola volta, come indicato nella Tabella 11.

Tabella 11. Numero di reazioni per lo strumento LightCycler 1.2

Campioni	Reazioni
Con la miscela di primer e sonda JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 standard M-VF	4 reazioni, ognuna testata una sola volta
n campioni di DNA	n x 2 reazioni
2 controlli DNA	2 reazioni: PC-VF e NC-VF, ognuna testata una sola volta
Acqua come materiale di controllo	1 reazione
Con la miscela di primer e sonda JAK2 wild-type (PPM-WT)	
4 standard wild-type	4 reazioni, ognuna testata una sola volta
n campioni di DNA	n x 2 reazioni
2 controlli DNA	2 reazioni: PC-VF e NC-VF, ognuna testata una sola volta
Acqua come materiale di controllo	1 reazione

Processazione dei campioni su strumento LightCycler 1.2

Si consiglia di effettuare il test su 4 campioni di DNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e delle miscele di primer e sonda. La configurazione capillare in Figura 6 mostra un esempio dell'esperimento.

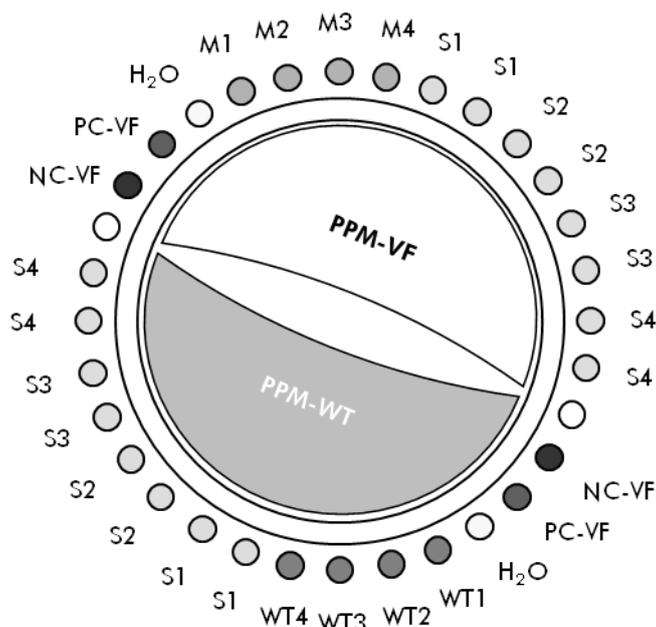


Figura 6. Configurazione consigliata del rotore per ogni esperimento con il kit ipsogen JAK2 MutaQuant. PC-VF: controllo positivo V617F; NC-VF: controllo negativo V617F; M-VF: standard V617F; M-WT: standard wild-type; S: campione di DNA; H₂O: acqua come materiale di controllo.

qPCR su strumento LightCycler 1.2

Nota: Visti i requisiti tecnologici particolari, gli esperimenti condotti con LightCycler devono essere effettuati utilizzando reagenti specifici. Si consiglia di utilizzare LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe e di attenersi alle istruzioni del produttore per la preparazione della miscela master 5x.

Nota: Eseguire tutte le fasi su ghiaccio.

Procedura

1. **Scongelare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.**
2. **Preparare la seguente miscela qPCR a seconda del numero di campioni da sottoporre a test.**

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

Le tabelle 12 e 13 mostrano lo schema di pipettatura per la preparazione di una miscela di reagente, calcolata per raggiungere un volume di reazione finale di 20 μ l. È possibile preparare una premiscela, a seconda del numero di reazioni, utilizzando la medesima miscela di primer e sonda (PPM-VF o PPM-WT). Sono inclusi volumi extra per compensare eventuali errori di pipettatura.

Tabella 12. Preparazione della miscela qPCR

Componente	1 reazione (μl)	Premiscela V617F 15 + 1 reazioni (μl)	Concentrazione finale
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix appena preparata, 5x	4,0	64,0	1x
Miscela di primer e sonda, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	10,2	163,2	–
Campione (da aggiungere alla fase 4)	5,0	5 ognuno	–
Volume totale	20,0	20 ognuno	–

Tabella 13. Preparazione della miscela qPCR

Componente	1 reazione (μl)	Premiscela WT 15 + 1 reazioni (μl)	Concentrazione finale
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix appena preparata, 5x	4,0	64,0	1x
Miscela di primer e sonda, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	10,2	163,2	–
Campione (da aggiungere alla fase 4)	5,0	5 ognuno	–
Volume totale	20,0	20 ognuno	–

- 3. Dispensare 15 μ l della premiscela qPCR (VF o WT) in ogni capillare.**
- 4. Aggiungere 5 μ l di materiale da quantificare (25 ng di DNA genomico campione o controllo) nella provetta corrispondente (volume totale 20 μ l).**
- 5. Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
- 6. Posizionare i capillari negli adattatori forniti assieme all'apparecchiatura e centrifugare brevemente (700 x g, circa 10 secondi).**
- 7. Caricare i capillari nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.**
- 8. Programmare lo strumento LightCycler 1.2 con il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 14.**

Tabella 14. Profilo termico

Modalità di analisi	Quantificazione
Mantenimento 1	Temperatura: 55°C Durata: 2 minuti Rampa: 20
Mantenimento 2	Temperatura: 95°C Durata: 10 minuti Rampa: 20
Ciclizzazione	50 volte 95°C per 15 secondi; rampa: 20 66°C per 1 minuto; rampa: 20; con acquisizione della fluorescenza FAM: singolo

9. Con il LightCycler 1.2, si consiglia di utilizzare la modalità F1/F2 e "2nd derivative analysis" (analisi della derivata seconda). Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 14.

Interpretazione dei risultati

Principio di analisi dei dati

I dati relativi ai valori del ciclo soglia (C_T) e al punto di superamento (C_P) possono essere esportati dallo strumento di analisi della qPCR e incollati in un file Excel® per l'analisi. È poi possibile utilizzare tali valori per calcolare il valore medio di C_P e C_T . I valori C_T standard medi possono quindi essere riportati su un grafico per generare una curva standard di entrambi gli standard wild-type e V617F, applicando la seguente equazione e la Tabella 15.

$y = \text{Media } C_P$; $x = \log_{10} \text{ CN}$ dove CN = numero di copie dei geni nel campione da $5 \mu\text{l}$

Tabella 15. Dati quantitativi per gli standard wild-type e V617F

Standard	Numero di copie (CN)	$\log_{10} \text{ CN}$
M1-VF	5×10^1 VF	1,7
M2-VF	5×10^2 VF	2,7
M3-VF	5×10^3 VF	3,7
M4-VF	5×10^4 VF	4,7
WT-1	5×10^1 WT	1,7
WT-2	5×10^2 WT	2,7
WT-3	5×10^3 WT	3,7
WT-4	5×10^4 WT	4,7

Nota: Ogni utente deve misurare la propria riproducibilità in laboratorio.

Curva standard e criteri di qualità

Nelle figure 7 e 9 sono illustrati alcuni esempi dei risultati ottenuto con il kit *ipsogen JAK2 MutaQuant*, mentre le figure 8 e 10 mostrano un esempio della curva teorica calcolata con 4 diluizioni standard.

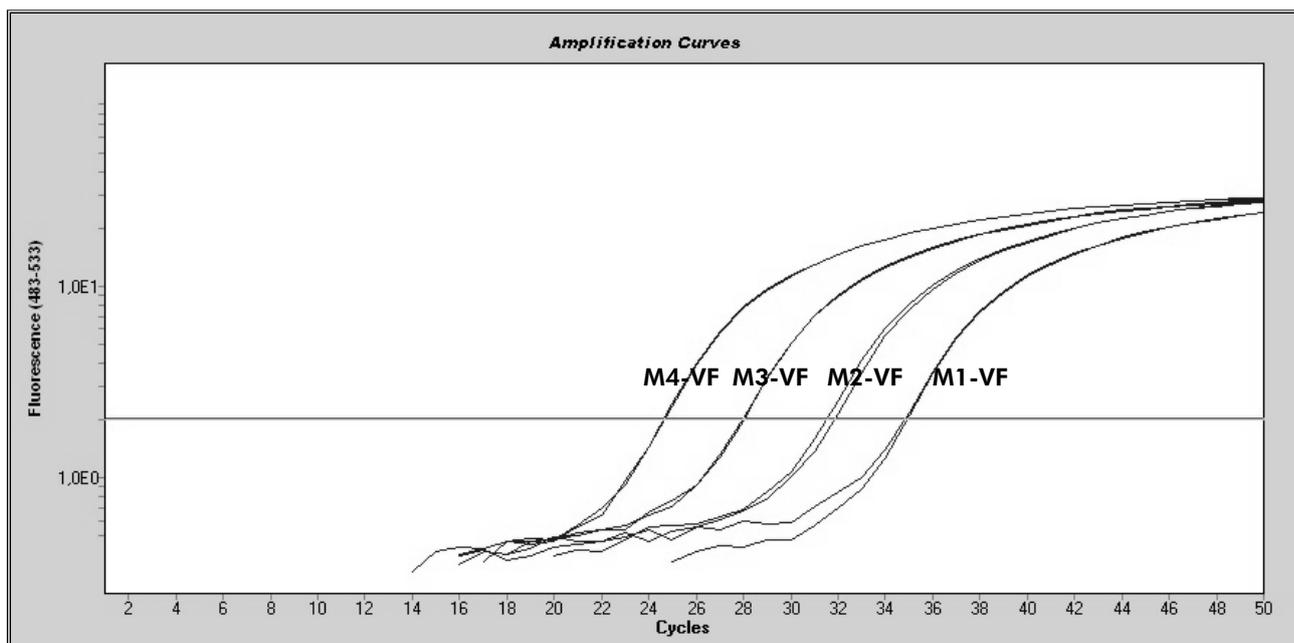


Figura 7. Diagramma di amplificazione delle copie 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 e 5×10^4 del plasmide JAK2 V617F (rispettivamente controlli M1-VF, M2-VF, M3-VF e M4-VF).

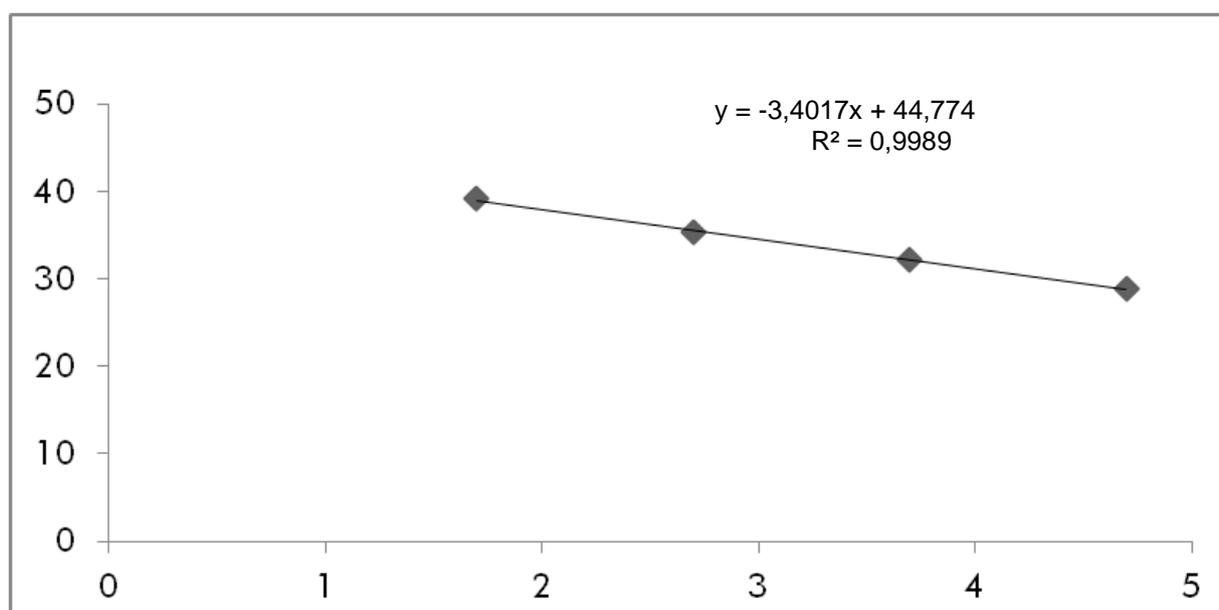


Figura 8. Curva standard per JAK2 V617F.

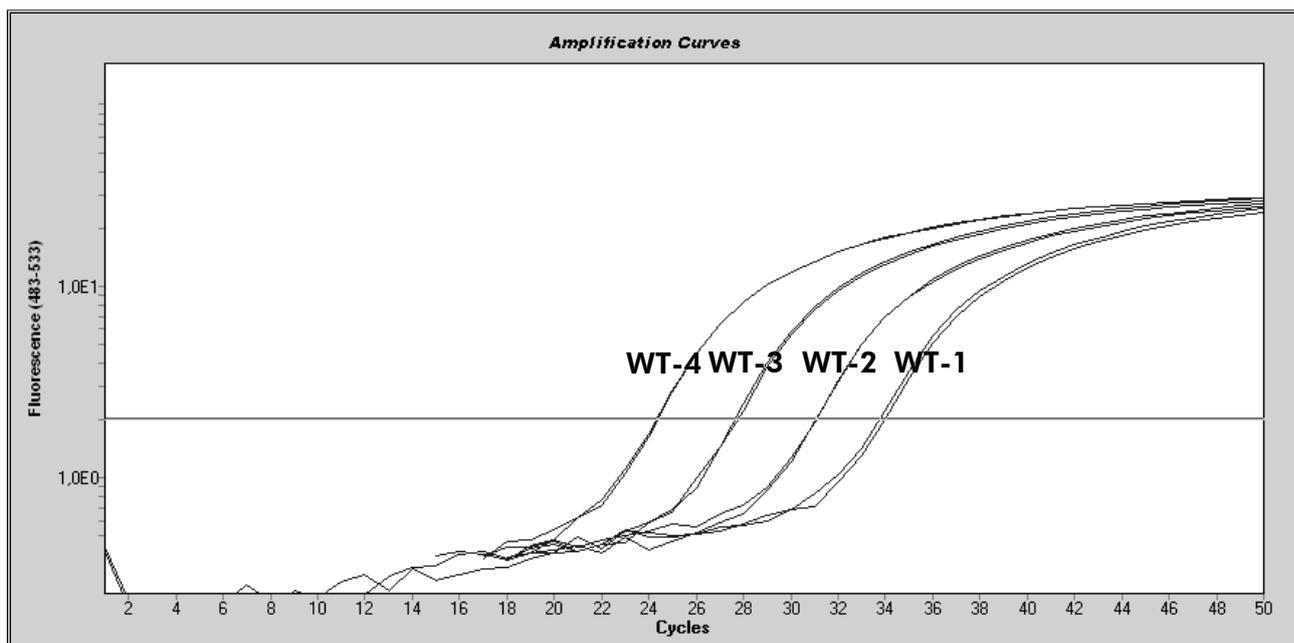


Figura 9. Diagramma di amplificazione delle copie 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 e 5×10^4 del plasmide JAK2 wild-type (rispettivamente controlli WT-1, WT-2, WT-3 e WT-4).

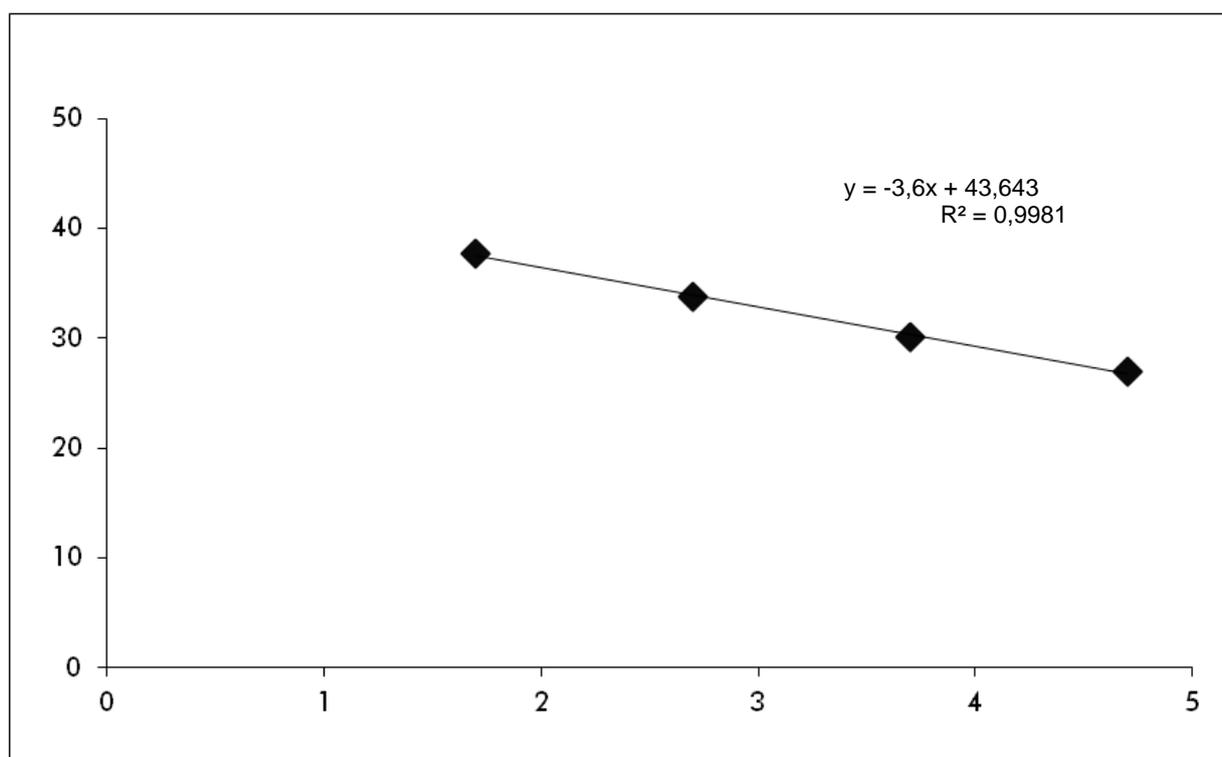


Figura 10. Curva standard per JAK2 wild-type.

Poiché gli standard sono stati diluiti 10 volte, la pendenza teorica della curva è -3,32. Una pendenza tra -3,0 e -3,9 può essere accettabile, posto che R^2 sia

>0,95 (12). Tuttavia, per ottenere risultati precisi è auspicabile un valore di R² >0,98 (13).

Le equazioni della curva standard possono essere utilizzate per calcolare numeri di copie V617F e WT log₁₀ nei campioni non noti.

L'equazione della curva standard V617F deve essere impiegata per trasformare la media dei valori grezzi di C_P/ C_T (ottenuta con PPM-VF) in numeri di copie JAK2 V617F (CN_{V617F}) per i campioni non noti e di controllo.

$$\log_{10} \text{CN}_{V617F} = \frac{(\text{Media } C_{pV617F} - \text{Intercetta curva standard}_{V617F})}{\text{Pendenza curva standard}_{V617F}}$$

L'equazione della curva standard wild-type deve essere impiegata per trasformare la media dei valori grezzi di C_P/C_T (ottenuta con PPM-WT) in numeri di copie JAK2 (CN_{WT}) per i campioni non noti e di controllo.

$$\log_{10} \text{CN}_{WT} = \frac{(\text{Media } C_{pWT} - \text{Intercetta curva standard}_{WT})}{\text{Pendenza curva standard}_{WT}}$$

Espressione dei risultati

I risultati si riferiscono a 25 ng di DNA genomico totale e devono essere espressi come percentuale di JAK2 V617F, come riportato di seguito.

$$\text{JAK2 V617F \%} = \frac{\text{CN}_{V617F}}{(\text{CN}_{V617F} + \text{CN}_{WT})} \times 100$$

Riproducibilità tra replicati

I dati ottenuti devono essere consistenti tra i duplicati.

Controlli positivi e negativi

Il controllo positivo o PC-VF deve dare una percentuale di JAK2 V617F maggiore del 99,9%.

Il controllo negativo o NC-VF deve dare una percentuale di JAK2 V617F inferiore allo 0,1%.

Se tali controlli cessano di funzionare correttamente, per trovare una soluzione vedere "Guida alla risoluzione dei problemi", pag. 37.

Acqua come materiale di controllo

In caso di controlli negativi, CN deve essere uguale a zero sia per il rilevamento di JAK2 V617F che di JAK2 wild-type.

La contaminazione crociata genera controllo acqua positivo. Per trovare una soluzione, vedere la seguente "Guida alla risoluzione dei problemi".

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per chiarire eventuali dubbi che possano presentarsi. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti addetti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN sono sempre lieti di rispondere a qualsiasi domanda possiate avere, per quanto riguarda le informazioni ed i protocolli presenti in questo manuale, oppure le tecnologie per campioni e test (per le informazioni sui contatti, consultare "Informazioni sui contatti", pag. 46).

Commenti e suggerimenti

Curva standard per wild-type o V617F non lineare

Inversione delle provette, inversione durante la distribuzione, contaminazione crociata, degradazione parziale dello standard, reagente RQPCR, amplificazione aspecifica o errore programma PCR

Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.

Conservare il contenuto del kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant a una temperatura compresa tra -15°C e -30°C e mantenere le miscele di primer e sonda lontane dalla luce. Vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti", pag. 13.

Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.

Segnale basso o assente per uno degli standard

Standard non distribuito o utilizzo della stessa miscela PPM

Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.

Ripetere la sequenza PCR.

Commenti e suggerimenti

Il controllo (H₂O) negativo è positivo

Contaminazione crociata, contaminazione dei reagenti, errore dello strumento, inversione del pozzetto o del capillare oppure degradazione della sonda

Sostituire tutti i reagenti interessati.

Manipolare sempre i campioni, i componenti del kit e i materiali di consumo secondo le pratiche comunemente accettate per evitare contaminazione crociata.

Mantenere le miscele di primer e sonda lontane dalla luce.

Controllare la presenza di falsi positivi sulle curve di fluorescenza.

Nessun segnale, anche nel controllo standard

a) Canale di rilevazione errato

Impostare il canale a F1/F2 o 530 nm/640 nm.

b) Errore di pipettatura o reagenti mancanti

Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.

Ripetere la sequenza PCR.

c) Nessun programma di acquisizione dati

Controllare il programma del ciclo.

Selezionare la modalità di acquisizione "Single" (singola) al termine di ogni segmento di ibridazione del programma PCR.

Segnale assente o basso nei campioni ma controlli standard corretti

Effetti inibitori del materiale campione causati da insufficiente purificazione

Controllare sempre la qualità (OD₂₆₀/OD₂₈₀) e la concentrazione del DNA prima di iniziare il test.

Ripetere la preparazione del DNA.

Commenti e suggerimenti

Intensità di fluorescenza troppo bassa

- a) Conservazione inadeguata dei componenti del kit
- Conservare i reagenti in aliquote.
Conservare il contenuto del kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* a una temperatura compresa tra -15°C e -30°C e mantenere le miscele di primer e sonda lontane dalla luce. Vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti", pag. 13.
Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.
- b) Quantità iniziale di DNA bersaglio molto bassa
- Controllare la quantità del DNA campione.

Nota: Possono verificarsi effetti inibitori a seconda del metodo di preparazione del DNA selezionato.

I controlli negativi sono positivi

Contaminazione crociata

Sostituire tutti i reagenti interessati.
Ripetere l'esperimento con nuove aliquote di tutti i reagenti.
Manipolare sempre i campioni, i componenti del kit e i materiali di consumo secondo le pratiche comunemente accettate per evitare contaminazione crociata.

Variazioni dell'intensità di fluorescenza

- a) Errore di pipettatura
- Centrifugare tutti i reagenti dopo lo scongelamento.
La variabilità di LightCycler causata dal cosiddetto "errore di pipettatura" può essere ridotta analizzando i dati in modalità F1/F2 o 530 nm/640 nm.

Commenti e suggerimenti

- | | |
|--|--|
| b) Centrifugazione insufficiente della piastra, delle provette o dei capillari, oppure la miscela PCR preparata forse si trova ancora nel recipiente superiore del capillare, oppure potrebbe esservi una bolla d'aria nella punta del capillare | Centrifugare sempre i capillari caricati con la miscela di reazione come descritto nel manuale operativo specifico dell'apparecchiatura. |
| c) Superficie esterna della punta del capillare sporca | Indossare sempre i guanti durante la manipolazione dei capillari. |

Segnale dei controlli positivi di wild-type o V617F con PPM reciproca

Contaminazione crociata, contaminazione dei reagenti o inversione del capillare

Sostituire tutti i reagenti interessati.

Ripetere l'esperimento con nuove aliquote di tutti i reagenti.

Manipolare sempre i campioni, i componenti del kit e i materiali di consumo secondo le pratiche comunemente accettate per evitare contaminazione crociata.

Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.

Rilevazione invertita del controllo positivo

Inversione distribuzione della PPM nel pozzetto o nel capillare o nella premiscela

Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.

Nessun segnale per uno o entrambi i controlli positivi

PPM o DNA di controllo mancante

Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.

Elevato rumore di fondo

Bleaching del fluoroforo

Conservare e manipolare la sonda lontano dalla luce.

Scarsa riproducibilità dei campioni duplicati

Errore di pipettatura o contaminazione crociata

Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.

Controllo qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità di QIAGEN, dotato di certificazione ISO, ogni lotto di *ipsogen* JAK2 MutaQuant è stato sottoposto a test sulla base di specifiche tecniche predefinite, in modo da garantire la costante qualità del prodotto. I certificati di analisi sono disponibili su richiesta sul sito www.qiagen.com/support/.

Limiti della metodica

Gli utilizzatori del kit devono essere adeguatamente formati e avere acquisito dimestichezza con questa tecnica prima di iniziare a usare il dispositivo. Il kit deve essere impiegato seguendo le istruzioni fornite nel presente manuale, assieme agli strumenti approvati indicati in "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 11.

Gli eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio. È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia coperta dagli studi di valutazione delle prestazioni QIAGEN.

Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.

Caratteristiche delle prestazioni

Studi non clinici

Precisione

Uno studio di precisione è stato condotto su 12 campioni di DNA estratti da linee cellulari corrispondenti a carichi allelici JAK2 V617F diversi. Sono state eseguite in totale 80 misurazioni su ogni campione, utilizzando 3 diversi lotti del kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant. Questo studio di precisione ha utilizzato un sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR.

I dati analitici sono riassunti nella Tabella 15.

Tabella 15. Campioni di DNA per i dati di precisione

Campione	% teorica JAK2 V617F		Media (%)	CV (%)	Percentile	
	n*	5			95	
A	0	73	0,004	117,5	0,000	0,015
B	0,05	80	0,101	89,2	0,003	0,284
C	0,5	79	0,449	61,6	0,161	0,950
D	1	68	1,169	41,6	0,611	1,998
E	2	80	2,046	33,5	1,168	3,185
F	4	80	3,733	30,6	2,120	5,560
G	5	77	5,246	22,4	3,647	7,309
H	12,5	80	16,633	16,6	12,792	22,335
I	31	80	28,602	14,8	22,705	34,773
J	50	76	56,181	6,6	50,024	63,724
K	78	80	80,153	3,8	75,352	85,551
L	100	70	99,998	0,003	99,992	100,000

* Sono stati esclusi i valori oltre la norma, cioè quei valori minori del quartile inferiore meno 3 volte lo scarto interquartile, o maggiori del quartile superiore più 3 volte lo scarto interquartile su un grafico box-plot.

n = numero di campioni validati; CV = coefficiente globale di variazione.

Limite del bianco e limite di rilevamento

Il livello di fondo o il livello del bianco (LOB) è stato determinato su campioni negativi (8 campioni, 76 misurazioni) ed è risultato pari allo 0,014%.

Il limite di rilevamento (LOD) è stato determinato utilizzando campioni noti come campioni positivi, ma con bassa espressione (7 campioni, 68 misurazioni). Tale valore è risultato pari allo 0,061%, con limite superiore dell'intervallo di confidenza al 90% pari allo 0,091%.

Questo livello ottimale di sensibilità può essere ottenuto su campioni contenenti almeno 10.000 copie del gene JAK2 (mutazione wild-type o V617F).

I dati di quantificazione devono essere registrati come riportato di seguito.

- JAK2 V617F $\leq 0,014\%$ può essere interpretato come se la mutazione JAK2 V617F non fosse stata rilevata.
- JAK2 V617F $> 0,014\%$ ma $< 0,091\%$ può essere interpretato come risultato non conclusivo.
- JAK2 V617F $\geq 0,091\%$ può essere interpretato come risultato positivo, con rilevamento della mutazione JAK2 V617F.

Linearità

Sono stati eseguiti studi di linearità su 12 campioni, ognuno dei quali ottenuto da una miscela diversa di DNA estratto da linee cellulari positive e negative alla mutazione JAK2 V617F. Ogni campione è stato testato 5 volte. I dati ricavati da questo studio mostrano che il kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant ha fornito risultati lineari in tutti gli intervalli dinamici.

Studi clinici

87 campioni di DNA estratti dal sangue o dal midollo osseo di pazienti sono stati testati utilizzando il kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant. È stata inoltre quantificata la percentuale di mutazioni JAK2 V617F, poi confrontata con i risultati del test di screening ottenuti con il kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ (catalogo n° 673223). I dati ottenuti sono riportati nella tabella 16.

Tabella 16. Tabella di contingenza che mostra l'uniformità tra i risultati ottenuti con il kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant e il kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ

		Risultati ottenuti con il kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ			
		Mutazione rilevata	Risultato non conclusivo	Mutazione non rilevata	n
Risultati ottenuti con il kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant	Mutazione rilevata	40	2	7	49
	Risultato non conclusivo	0	0	21	21
	Mutazione non rilevata	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Uniformità positiva	100% (intervallo di confidenza al 95%: 91%, 100%)				
Uniformità negativa	71% (intervallo di confidenza al 95%: 51%, 85%)				
Uniformità totale	89% (intervallo di confidenza al 95%: 79%, 95%)				

Bibliografia

1. National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT_008413..
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
3. 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.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
5. Baxter, E. J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, **22**, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865.
12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Simboli

Sulla confezione o sull'etichettatura possono comparire i seguenti simboli:



Il kit contiene reagenti sufficienti per <N> reazioni



Data di scadenza



Dispositivo medico per diagnostica in vitro



Numero di catalogo



Numero di lotto



Numero di materiale



Global Trade Item Number



Limite di temperatura



Produttore



Fare riferimento alle informazioni riportate nel manuale

Informazioni sui contatti

Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultate il nostro sito www.qiagen.com/Support, chiamare il numero 00800-22-44-6000 oppure contattate il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (consultate il retro della copertina o il sito www.qiagen.com).

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Indice	Cat. n°
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Per 12 reazioni: controllo gene JAK2 wild-type, gene di controllo JAK2 V617F, miscela di primer e sonda PPM-WT, miscela di primer e sonda PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Per 24 reazioni: controllo gene JAK2 wild-type, gene di controllo JAK2 V617F, miscela di primer e sonda PPM-WT, miscela di primer e sonda PPM-VF	673523
Rotor-Gene Q MDx - per analisi della PCR in tempo reale convalidata per IVD in applicazioni cliniche		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali, installazione e addestramento non inclusi	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali, installazione e addestramento	9002033

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com, oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

Questo prodotto è destinato all'uso diagnostico in vitro. I prodotti *ipsogen* non possono essere rivenduti, modificati per la rivendita o impiegati per la realizzazione di prodotti commerciali senza il consenso scritto di QIAGEN.

Le informazioni contenute in questo documento sono soggette a modifiche senza preavviso. QIAGEN non si assume responsabilità per errori eventualmente riscontrati in questo documento. Questo documento è considerato completo e accurato al momento della pubblicazione. In nessun caso QIAGEN potrà essere ritenuta responsabile di danni accidentali, particolari, multipli o secondari in relazione all'impiego di questo documento o derivanti da quest'ultimo.

I prodotti *ipsogen* sono garantiti conformi alle specifiche indicate. L'unico obbligo di QIAGEN, e l'unico rimedio a cui ha diritto il cliente, è la sostituzione gratuita dei prodotti in caso gli stessi non offrano le prestazioni richieste.

La mutazione JAK2 V617F e i suoi utilizzi sono protetti da brevetto, tra cui il brevetto europeo EP1692281, i brevetti USA 7.429.456 e 7.781.199, le domande di brevetto USA US20090162849 e US20120066776 e le controparti straniere.

L'acquisto del presente prodotto non conferisce alcun diritto all'uso in applicazioni cliniche per farmaci mirati a JAK2V617F. QIAGEN sviluppa programmi in licenza specifici per tali usi. Contattare l'ufficio legale di QIAGEN all'indirizzo jak2licenses@qiagen.com.

Marchi: QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, MutaQuant®, Pyrosequencing®, Rotor-Gene® (gruppo QIAGEN); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, SYBR®, TAMRA™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); HybProbe®, LightCycler®, TaqMan® (gruppo Roche).

Contratto di Licenza Limitato

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant alle seguenti condizioni:

1. Il kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale del kit ipsogen JAK2 MutaQuant* e in combinazione con i componenti contenuti nel kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti di questo kit ad altri componenti non contenuti nel kit stesso, ad eccezione di quanto descritto nel *Manuale del kit ipsogen JAK2 MutaQuant* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente kit ed i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non compiere e nel non consentire ad altri di compiere o contribuire a compiere azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato, e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per le condizioni di licenza aggiornate, consultare il sito www.qiagen.com.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

www.qiagen.com

