

# Petunjuk Penggunaan *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 RGQ PCR Kit



Versi 2



Untuk Penggunaan Diagnostik In Vitro

Untuk digunakan dengan instrumen Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM



0197



674623



QIAGEN, GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, JERMAN



R1

1123592ID



# Daftar Isi

Tujuan Penggunaan .....	6
Pengguna yang Ditujukan .....	6
Deskripsi dan Prinsip .....	7
Rangkuman dan penjelasan .....	7
Prinsip prosedur .....	11
Bahan yang Disediakan .....	15
Isi kit .....	15
Isi kit (lanjutan) .....	16
Komponen kit .....	17
Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Disediakan .....	19
Barang habis pakai dan reagen untuk ekstraksi DNA manual .....	19
Bahan habis pakai dan reagen untuk ekstraksi DNA otomatis .....	19
Bahan habis pakai dan reagen untuk PCR .....	19
Peralatan .....	20
Peralatan untuk persiapan sampel .....	20
Peralatan untuk real-time PCR .....	20
Peringatan dan Pencegahan .....	21
Informasi keselamatan .....	21
Informasi darurat .....	21
Tindakan pencegahan .....	22
Penyimpanan dan Penanganan Reagen .....	24
Kondisi pengiriman .....	24

Kondisi penyimpanan .....	24
Stabilitas saat penggunaan .....	25
Penyimpanan dan Penanganan Spesimen .....	26
Sampel darah utuh .....	26
Sampel DNA genomik .....	26
Protokol: Ekstraksi dan Persiapan DNA Genomik dari Darah Utuh.....	27
Ekstraksi DNA genomik manual menggunakan QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit .....	27
Ekstraksi DNA Genomik Otomatis Menggunakan QIAasyphony DSP DNA Mini Kit .....	32
Kualifikasi dan kuantifikasi DNA .....	38
Normalisasi sampel DNA genomik .....	38
Protokol: qPCR pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM .....	39
Penginstalan perangkat lunak inti Rotor-Gene AssayManager v2.1 .....	40
Penginstalan Plug-in Gamma dan pengimporan profil uji kadar .....	41
Pemrosesan sampel pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dengan rotor 72 tabung .....	44
qPCR pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dengan rotor 72 tabung .....	47
Interpretasi Hasil .....	60
Batasan .....	68
Karakteristik Kinerja .....	70
Kinerja Analitikal .....	70
Pengujian Panel Referensi Internasional WHO untuk JAK2 V617F Genomik (NIBSC, kode panel 16/120) .....	79
Kinerja Klinis .....	86

Ringkasan Keselamatan dan Kinerja.....	94
Pembuangan.....	95
Referensi.....	96
Panduan Pemecahan Masalah .....	98
Simbol.....	103
Informasi Pemesanan .....	105
Riwayat Revisi Dokumen.....	108

## Tujuan Penggunaan

*ipsogen*® JAK2 RGQ PCR Kit merupakan uji kadar PCR in vitro kuantitatif yang ditujukan untuk mendeteksi dan mengukur mutasi JAK2 V617F/G1849T dalam DNA genomik yang diekstraksi dari darah utuh perifer manusia yang diberi antikoagulan dengan 2K-EDTA. Hasil yang diperoleh dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dimaksudkan untuk digunakan sebagai tambahan untuk evaluasi dugaan neoplasma mieloproliferatif (MPN) negatif kromosom Philadelphia (Ph) dan pemantauan penyakit molekuler pada pasien MPN. Setiap hasil diagnostik yang dihasilkan harus ditafsirkan bersamaan dengan temuan klinis-patologis lainnya.

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dimaksudkan untuk digunakan hanya dengan instrumen QIAGEN Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM dan komponen alur kerja tervalidasi lainnya sebagaimana diuraikan dalam petunjuk penggunaan. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit bukanlah perangkat otomatis; tetapi, analisisnya dibantu oleh perangkat lunak khusus.

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit ditujukan untuk penggunaan diagnostik in vitro.

## Pengguna yang Ditujukan

Kit ini ditujukan untuk penggunaan profesional.

Produk ini hanya boleh digunakan oleh para profesional yang mendapat instruksi khusus dan terlatih dalam teknik biologi molekuler serta memahami teknologi ini. Prosedur perangkat akan diimplementasikan di lingkungan laboratorium biologi molekuler.

# Deskripsi dan Prinsip

## Rangkuman dan penjelasan

Mutasi somatik berulang, *V617F*, yang memengaruhi gen Janus tyrosine kinase 2 (*JAK2*), diidentifikasi pada 2005 (1–4), yang memicu terobosan besar dalam pemahaman, klasifikasi, dan diagnosis MPN. *JAK2* adalah molekul pensinyalan intraseluler yang sangat penting untuk sejumlah sitokin, termasuk eritropoietin.

Mutasi *JAK2 V617F* terdeteksi pada >95% pasien dengan polisitemia vera (polycythemia vera, PV), dan pada sekitar 60% pasien dengan trombositemia esensial (essential thrombocythemia, ET) dan mielofibrosis primer (primary myelofibrosis, PMF) (5). *JAK2 V617F* juga telah terdeteksi pada beberapa kasus langka leukemia mielomonositik kronis, sindrom mielodisplastik (myelodysplastic syndrome, MDS), mastositosis sistemik dan leukemia neutrofilik kronis, tetapi pada 0% leukemia mieloid kronis (chronic myeloid leukemia, CML) (6).

Mutasi *JAK2 V617F* berhubungan dengan perubahan nukleotida tunggal dari nukleotida *JAK2* 1849 di ekson 14, yang menghasilkan substitusi valin (valine, V) menjadi fenilalanin (phenylalanine, F) yang unik pada posisi 617 protein (domain JH2). Gen *JAK2* mengkodekan tirosin kinase yang terlibat dalam pensinyalan reseptor sitokin melalui jalur STAT. Bila diaktifkan secara konstitutif, yang paling sering dilakukan melalui mutasi *JAK2 V617F*, hasilnya adalah transformasi progenitor eritroid, hipersensitivitas terhadap eritropoietin, dan aktivasi jalur pensinyalan hilir. Selain itu, dihipotesiskan bahwa *JAK2* yang tidak terkendali meningkatkan ekspresi onkogen, rekombinasi mitosis, dan ketidakstabilan genetik (7).

Secara tradisional, diagnosis MPN didasarkan pada histologi sumsum tulang klinis dan kriteria sitogenetik. Penemuan penanda molekuler spesifik penyakit menghasilkan penyederhanaan proses maupun peningkatan akurasi diagnostik. Deteksi mutasi *JAK2 V617F* merupakan bagian dari kriteria acuan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) 2016 untuk diagnosis MPN negatif BCR-ABL (8) (Tabel 1), dan keberadaan mutasi ini merupakan kriteria utama untuk konfirmasi diagnostik.

Tabel 1. Kriteria WHO untuk diagnosis MPN

Kriteria untuk diagnosis PV	
Utama	<div><div>1.</div><div>Hemoglobin (Hgb) &gt;16,5 g/dL (pria) atau &gt;16,0 g/dL (wanita) atau Hematokrit &gt;49% (pria) atau &gt;48% (wanita) atau Peningkatan massa sel darah merah &gt;25% di atas nilai prediksi normal rata-rata.</div></div> <div><div>2.</div><div>Biopsi sumsum tulang (Bone marrow, BM) menunjukkan hiperselularitas berdasarkan usia dengan pertumbuhan trilineage (panmielosis) termasuk proliferasi eritroid, granulosit, dan megakariosit yang menonjol dengan megakariosit pleomorfik dan matang (perbedaan ukuran)</div></div> <div><div>3.</div><div>Kehadiran mutasi JAK2V617F atau JAK2 ekson 12</div></div>
Minor	Tingkat eritropoietin serum subnormal

Diagnosis PV memerlukan terpenuhinya 3 kriteria utama, atau 2 kriteria utama pertama dan kriteria minor†.

† Kriteria nomor 2 (biopsi BM) mungkin tidak diperlukan dalam kasus dengan eritrositosis absolut berkelanjutan: kadar hemoglobin >18,5 g/dL pada pria (hematokrit, 55,5%) atau >16,5 g/dL pada wanita (hematokrit, 49,5%) jika ada kriteria utama 3 dan kriteria minor. Namun, mielofibrosis awal (terdapat pada hingga 20% pasien) hanya dapat dideteksi dengan melakukan biopsi BM; temuan ini dapat memprediksi perkembangan yang lebih cepat menjadi mielofibrosis nyata (MF pasca-PV).

Kriteria untuk diagnosis ET	
Utama	<div><div>1.</div><div>Jumlah trombosit <math>\geq 450 \times 10^9 /L</math></div></div> <div><div>2.</div><div>Biopsi BM menunjukkan proliferasi terutama pada garis keturunan megakariosit dengan peningkatan jumlah megakariosit yang membesar dan matang dengan inti hiperlobulasi. Tidak ada peningkatan signifikan atau pergeseran ke kiri pada granulopoiesis neutrofil atau eritropoiesis, dan sangat jarang terjadi peningkatan kecil (tingkat 1) pada serat retikulin</div></div> <div><div>3.</div><div>Tidak memenuhi kriteria WHO untuk BCR-ABL1+ CML, PV, PMF, sindrom mielodisplastik, atau neoplasma mieloid lainnya</div></div> <div><div>4.</div><div>Kehadiran mutasi JAK2, CALR, atau MPL</div></div>
Minor	Adanya penanda klonal atau tidak adanya bukti trombositosis reaktif

Diagnosis ET mengharuskan terpenuhinya semua 4 kriteria utama, atau 3 kriteria utama pertama dan kriteria minor.



### Kriteria untuk diagnosis prePMF

Utama	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proliferasi megakariosit dan atipia, tanpa fibrosis retikulin &gt; tingkat 1, disertai peningkatan selularitas BM yang disesuaikan dengan usia, proliferasi granulosit, dan seringkali penurunan eritropoiesis.</li> <li>2. Tidak memenuhi kriteria WHO untuk <i>BCR-ABL1</i><sup>+</sup> CML, PV, ET, sindrom mielodisplastik, atau neoplasma mieloid lainnya</li> <li>3. Adanya mutasi <i>JAK2</i>, <i>CALR</i>, <i>MPL</i> atau jika tidak ada mutasi tersebut, adanya penanda klonal lain,<sup>†</sup> atau tidak adanya fibrosis retikulin BM reaktif minor<sup>‡</sup></li> </ol>
Minor	<p>Ada setidaknya 1 dari poin berikut, dikonfirmasi dalam 2 penentuan berturut-turut:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>a.) Anemia yang tidak disebabkan oleh kondisi komorbid</li> <li>b.) Leukositosis <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li> <li>c.) Splenomegali teraba</li> <li>d.) Laktat dehidrogenase (Lactate dehydrogenase, LDH) meningkat hingga melebihi batas normal atas kisaran referensi institusional</li> </ol>

Diagnosis prePMF memerlukan terpenuhinya semua 3 kriteria utama, dan setidaknya 1 kriteria minor.

<sup>†</sup> Bila tidak ditemukan salah satu dari 3 mutasi klonal utama, pencarian mutasi penyerta yang paling sering (misalnya, *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) akan membantu dalam menentukan sifat klonal penyakit.

<sup>‡</sup> Fibrosis retikulin minor (tingkat 1) sekunder akibat infeksi, gangguan autoimun atau kondisi peradangan kronis lainnya, leukemia sel berbulu atau neoplasma limfoid lainnya, keganasan metastasis, atau mielopati toksik (kronis).

### Kriteria untuk diagnosis PMF nyata

- |       |   |
|-------|---|
| Utama | <ol style="list-style-type: none"><li>1. Adanya proliferasi megakariosit dan atipia, disertai fibrosis retikulin dan/atau kolagen derajat 2 atau 3</li><li>2. Tidak memenuhi kriteria WHO untuk ET, PV, <i>BCR-ABL1</i><sup>+</sup> CML, sindrom mielodisplastik, atau neoplasma mieloid lainnya</li><li>3. Adanya mutasi <i>JAK2</i>, <i>CALR</i>, atau <i>MPL</i> atau jika tidak ada mutasi tersebut, adanya penanda klonal lain, <sup>†</sup> atau tidak adanya mielofibrosis reaktif<sup>‡</sup></li></ol> |
|-------|---|

- |       |   |
|-------|---|
| Minor | <p>Ada setidaknya 1 dari poin berikut, dikonfirmasi dalam 2 penentuan berturut-turut:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>a.) Anemia yang tidak disebabkan oleh kondisi komorbid</li><li>b.) Leukositosis <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li><li>c.) Splenomegali teraba</li><li>d.) Laktat dehidrogenase (Lactate dehydrogenase, LDH) meningkat hingga melebihi batas normal atas kisaran referensi institusional</li><li>e.) Leukoeritroblastosis</li></ol> |
|-------|---|

Diagnosis PMF nyata memerlukan terpenuhinya semua 3 kriteria utama, dan setidaknya 1 kriteria minor

† Bila tidak ditemukan salah satu dari 3 mutasi klonal utama, pencarian mutasi penyerta yang paling sering (misalnya, *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) akan membantu dalam menentukan sifat klonal penyakit.

‡ Fibrosis BM sekunder akibat infeksi, gangguan autoimun, atau kondisi peradangan kronis lainnya, leukemia sel berbulu atau neoplasma limfoid lainnya, keganasan metastasis, atau mielopati toksik (kronis).

Catatan: CML: Leukemia mieloid kronis; ET: Trombositemia esensial; PMF: Mielofibrosis primer; PV: Polisitemia vera; WHO: Organisasi Kesehatan Dunia

Selain itu, penemuan mutasi *JAK2 V617F* pada pasien MPN telah mengungkap target baru untuk terapi. Pemantauan penyakit molekuler yang mengukur beban mutasi *JAK2 V617F* telah terbukti berguna untuk menilai respons terhadap pengobatan dan memprediksi kekambuhan pada pasien yang menjalani transplantasi sel induk alogenik (9). Konsep respons molekuler ditentukan secara jelas oleh rekomendasi terkini European LeukemiaNet (ELN) dan International Working Group-Myeloproliferative Neoplasmas Research and Treatment (IWG-MRT) (10, 11) dan dirujuk dalam pedoman National Comprehensive Cancer Network

(NCCN) (12) dan European Society of Medical Oncology (ESMO) (5). Respons Molekuler Lengkap didefinisikan sebagai pemberantasan kelainan molekuler yang sudah ada sebelumnya dan Respons Molekuler Parsial sebagai penurunan  $\geq 50\%$  dalam beban alel mutan *JAK2 V617F* (respons parsial hanya berlaku untuk pasien dengan setidaknya 20% beban alel mutan *JAK2 V617F* di garis dasar) (10,11).

Sejak tahun 2006, beberapa metode yang pada dasarnya berbasis pada teknik PCR atau sekuensing tersedia, sebagai pengujian yang dikembangkan di laboratorium untuk mendeteksi keberadaan dan berpotensi mengukur *JAK2 V617F*. Pengujian ini mempunyai kinerja analitis yang berbeda, terutama berkenaan dengan presisi dan tingkat sensitivitas. Perbedaan ini dapat memengaruhi kebutuhan analisis sumsum tulang, waktu yang dibutuhkan untuk menetapkan diagnosis akhir, dan, kemungkinan, pada kinerja pemantauan penyakit molekuler dan diagnostik.

Mengingat berbagai macam fraksi alel mutan *JAK2 V617F* potensial yang mungkin ditemui di MPN (dengan kadar serendah 1%), laboratorium didorong untuk menawarkan pengujian mutasi *JAK2 V617F* pada sensitivitas analitis yang tinggi. Teknik yang sesuai harus memiliki batas deteksi yang rendah (setidaknya 1% untuk diagnosis dan setidaknya 0,1% untuk pemantauan penyakit molekuler) dan reproduksibilitas yang tinggi (5,13).

## Prinsip prosedur

Beberapa teknik berbeda telah diusulkan untuk secara kuantitatif menentukan proporsi polimorfisme nukleotida tunggal (single nucleotide polymorphisms, SNP) dalam sampel DNA. Beberapa teknik, seperti kurva peleburan dan sekuensing, hanya bersifat semi-kuantitatif. Metode yang didasarkan pada reaksi berantai polimerase kuantitatif (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) real-time lebih disukai karena sensitivitasnya yang lebih tinggi. Penggunaan primer spesifik SNP memungkinkan amplifikasi selektif alel mutan (mutant, MT) atau tipe liar (wild-type, WT) yang mudah dideteksi menggunakan instrumen qPCR real-time. Hal ini memungkinkan sensitivitas  $<0,1\%$ , yang sejalan dengan batas *JAK2* yang diterima saat ini sebesar 1% yang digunakan untuk kepositifan klinis untuk diagnostik dan batas deteksi

yang direkomendasikan dari beban alel *JAK2 V617F* sebesar  $\leq 0,1\%$  untuk tujuan pemantauan penyakit molekuler (5,13). Namun, perlu dicatat bahwa beberapa ahli klinis menganggap keberadaan muatan *JAK2 V617F* sebagai signifikan secara klinis pada saat diagnosis dan oleh karena itu diperlukan metode yang sensitif, seperti qPCR (14). *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* didasarkan pada teknik ini.

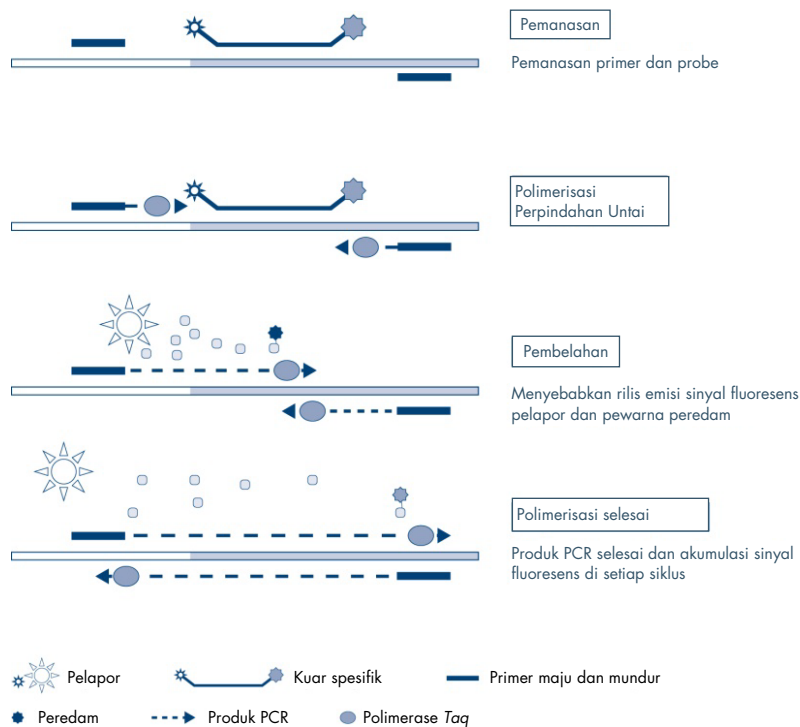
Penggunaan qPCR memungkinkan kuantifikasi produk PCR yang akurat selama fase eksponensial dari proses amplifikasi PCR. Data PCR kuantitatif dapat diperoleh dengan cepat, tanpa pemrosesan pasca-PCR, melalui deteksi sinyal fluoresens secara real-time selama dan/atau setelah siklus PCR, sehingga secara drastis mengurangi risiko kontaminasi produk PCR. Saat ini, tiga jenis utama teknik qPCR tersedia: analisis qPCR menggunakan pewarna SYBR® Green I, analisis qPCR menggunakan probe hidrolisis, dan analisis qPCR menggunakan probe hibridisasi.

Uji kadar QIAGEN memanfaatkan prinsip hidrolisis oligonukleotida qPCR. Selama PCR, primer maju atau mundur terhibridisasi menjadi sekuens tertentu. Oligonukleotida terangkai pewarna lain terkandung dalam campuran yang sama. Probe ini, yang terdiri dari oligonukleotida dan diberi label pewarna reporter 5' dan peredam bebas pewarna 3' hilir, berhibridisasi dengan sekuens target dalam produk PCR. Analisis qPCR dengan probe hidrolisis memanfaatkan aktivitas eksonuklease 5'→3' dari polimerase DNA *Thermus aquaticus* (*Taq*). Bila probe masih utuh, kedekatan pewarna reporter dengan peredam menghasilkan penekanan fluoresens reporter terutama melalui transfer energi tipe Förster.

Selama PCR, jika terdapat sasaran minat, primer maju dan mundur secara spesifik melakukan anil dan mengapit (flank) probe. Aktivitas eksonuklease 5'→3' dari polimerase DNA membelah probe antara reporter dan peredam hanya jika ketiga oligonukleotida berhibridisasi dengan target. Fragmen probe kemudian dipindahkan dari target, dan polimerisasi untai berlanjut. Ujung 3' probe diblokir untuk mencegah perpanjangan probe selama PCR (Gambar 1). Proses ini muncul di setiap siklus dan tidak mengganggu akumulasi eksponensial produk.

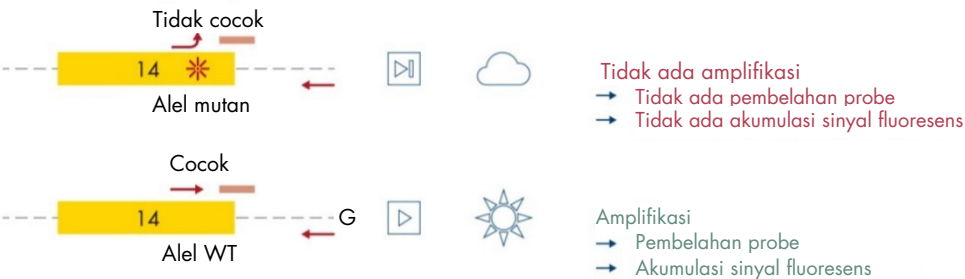
Peningkatan dalam sinyal fluoresens terdeteksi hanya jika sekuens target melengkapi primer dan kuar, oleh karena itu diamplifikasi selama PCR. Karena persyaratan ini, amplifikasi nonspesifik tidak terdeteksi. Dengan demikian, peningkatan fluoresensi berbanding lurus dengan amplifikasi target selama PCR.

Dalam qPCR, jumlah siklus PCR yang diperlukan untuk mendeteksi sinyal di atas ambang batas disebut Titik persilangan (Crossing point, Cp) atau Ambang batas siklus (Cycle threshold, CT) dan berbanding lurus dengan jumlah target yang ada di awal reaksi.

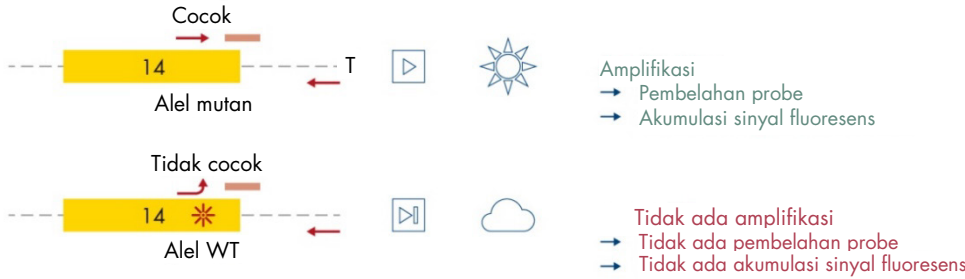


**Gambar 1. Prinsip reaksi.** Teknologi PCR spesifik alel kuantitatif yang digunakan dalam alat uji kadar ini memungkinkan deteksi SNP yang sensitif, akurat, dan sangat dapat direproduksi. Teknik ini didasarkan pada penggunaan primer terbalik spesifik, untuk tipe liar dan alel V617F, masing-masing (15). Hanya kecocokan sempurna antara primer dan DNA target yang memungkinkan perluasan dan amplifikasi dalam reaksi PCR (Gambar 2).

Campuran Reaksi WT



Campuran Reaksi WT



**Gambar 2. PCR spesifik alel.** Penggunaan primer tipe liar atau V617F dan campuran probe memungkinkan deteksi spesifik alel tipe liar atau mutasi dalam dua reaksi terpisah yang dilakukan menggunakan sampel yang sama. Hasilnya dapat dinyatakan sebagai persentase salinan mutan di antara total salinan JAK2. MT: mutan; WT: tipe liar.

# Bahan yang Disediakan

## Isi kit

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit No. katalog			24 674623
Warna	Identitas	ID Tabung	Volume
Merah	JAK2 Mutant Control (100% alel V617F)	MT Ctrl	33 µl
Hijau	JAK2 WT Control (100% alel tipe liar)	WT Ctrl	33 µl
Merah	JAK2 MT Quant Standard 1 (5 x 10 <sup>1</sup> salinan V617F/5 µl)	MT QS1	20 µl
Merah	JAK2 MT Quant Standard 2 (5 x 10 <sup>2</sup> salinan V617F/5 µl)	MT QS2	20 µl
Merah	JAK2 MT Quant Standard 3 (5 x 10 <sup>3</sup> salinan V617F/5 µl)	MT QS3	20 µl
Merah	JAK2 MT Quant Standard 4 (5 x 10 <sup>4</sup> salinan V617F/5 µl)	MT QS4	20 µl
Hijau	JAK2 WT Quant Standard 1 (5 x 10 <sup>1</sup> salinan tipe liar/5 µl)	WT QS1	20 µl
Hijau	JAK2 WT Quant Standard 2 (5 x 10 <sup>2</sup> salinan tipe liar/5 µl)	WT QS2	20 µl
Hijau	JAK2 WT Quant Standard 3 (5 x 10 <sup>3</sup> salinan tipe liar/5 µl)	WT QS3	20 µl

Isi kit (lanjutan)

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit  
No. katalog

24  
674623

Warna	Identitas	ID Tabung	Volume
Hijau	JAK2 WT Quant Standard 4 (5 x 10 <sup>4</sup> salinan tipe liar/5 µl)	WT QS4	20 µl
Merah	JAK2 MT Reaction Mix (Campuran Reaksi JAK2 MT)	MT Mix	1010 µl
Hijau	JAK2 WT Reaction Mix (Campuran Reaksi JAK2 WT)	WT Mix	1010 µl
Mint	Taq DNA polymerase (HotStarTaq® 5 unit/µl)	Taq	85 µl
Putih	Dapar TE untuk pengenceran sampel	TE	1,9 ml
Putih	Air tanpa kontrol templat (no template control, NTC)	NTC	1,9 ml
Buku Panduan <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit (Bahasa Inggris)			1



## Komponen kit

Komponen utama kit dijelaskan di bawah.

**Tabel 2. Reagen yang disediakan**

Reagen	Bahan Aktif	Volume
JAK2 Mutant Control (Kontrol Mutasi JAK2)	DNA garis sel yang membawa 100% alel V617F	33 µl
JAK2 WT Control (Kontrol JAK2 WT)	DNA garis sel yang membawa 100% alel tipe liar	33 µl
JAK2 MT Quant Standards (QS1 hingga QS4)	Plasmid yang membawa sekuens alel V617F	20 µl masing-masing
JAK2 WT Quant Standards (QS1 hingga QS4)	Plasmid yang membawa sekuens alel WT	20 µl masing-masing
JAK2 MT Reaction Mix (Campuran Reaksi JAK2 MT)	Oligonukleotida untuk mendeteksi alel MT dan kontrol internal, Buffer PCR, MgCl <sub>2</sub> , dNTP	1010 µl
JAK2 WT Reaction Mix (Campuran Reaksi JAK2 WT)	Oligonukleotida untuk mendeteksi alel WT dan kontrol internal, Buffer PCR, MgCl <sub>2</sub> , dNTP	1010 µl
Taq DNA polymerase (Polimerase DNA Taq)	Lakukan penyalan panas (hot-start) Polimerase DNA Taq dalam buffer penyimpanan	85 µl
Dapar TE untuk pengenceran sampel	Larutan dapar Tris-EDTA	1,9 ml
Air tanpa kontrol templat (no template control, NTC)	Air bebas nuklease	1,9 ml

## Reagen

Reagen yang disertakan dalam kit ini, yang tercantum dalam Tabel 2 di atas, adalah reagen yang diperlukan untuk mengencerkan sampel uji sesuai masukan yang dibutuhkan, dan untuk melakukan reaksi qPCR guna mendeteksi dan mengukur alel mutan *JAK2* dan tipe liar, guna menentukan persentase mutasi. Kontrol amplifikasi internal yang disertakan dalam campuran reaksi digunakan untuk memantau penghambatan qPCR, dan untuk mengesampingkan kegagalan reaksi PCR jika hasilnya negatif.

## Kontrol dan standar

Dua kontrol disertakan dalam kit: JAK2 Mutant Control yang digunakan sebagai kontrol positif untuk campuran reaksi JAK2 Mutan (Mutant, MT), dan Control JAK2 tipe liar (wild-type, WT) yang digunakan sebagai kontrol positif untuk campuran reaksi JAK2 tipe liar (wild-type, WT). Air bebas nuklease disediakan untuk melakukan kontrol tanpa templat untuk kedua campuran reaksi.

Empat Standar Kuantisasi (Quantitation Standards, QS) JAK2 Mutan (Mutant, MT) dan empat JAK2 tipe liar (wild-type, WT) disertakan dalam kit. Digunakan untuk menghitung jumlah salinan JAK2 MT dan WT dan kemudian persentase mutasi JAK2 V617F untuk sampel uji.

# Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Disediakan

## Barang habis pakai dan reagen untuk ekstraksi DNA manual

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (no. kat. 61104)
- Etanol (96–100%)
- **Catatan:** Jangan gunakan alkohol terdenaturasi karena mengandung zat lain seperti metanol atau metiletilketon.

## Bahan habis pakai dan reagen untuk ekstraksi DNA otomatis

- QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (no. kat. 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (no. kat. 997002)
- 8-Rod Covers (no. kat. 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (no. kat. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (no. kat. 990332)
- Elution Microtubes CL (no. kat. 19588)
- Tip disposal bags (no. kat. 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (Sarstedt®, no. kat. 72.694, [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com))

## Bahan habis pakai dan reagen untuk PCR

- Ujung pipet PCR steril tahan aerosol bebas nuklease dengan filter hidrofobik
- Tabung PCR bebas nuklease 1,5 ml atau 2,0 ml
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, untuk Rotor-Gene Q (no. kat. 981103 atau 981106)
- Es

## Peralatan

- Pipet yang dapat disesuaikan\* didedikasikan untuk PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Sarung tangan sekali pakai
- Mikser vorteks
- Blok pemanas untuk lisis sampel pada suhu 56 °C
- Sentrifus meja\* dengan rotor untuk tabung reaksi 0,5/1,5/2,0 ml (mampu mencapai 13.000–14.000 rpm)
- Spektrofotometer\*

## Peralatan untuk persiapan sampel

- Instrumen QIASymphony SP\* (no. kat. 9001297), versi perangkat lunak 4.0 atau yang lebih baru, aksesori yang disediakan, dan protokol Blood\_200\_V7\_DSP (atau versi yang lebih baru)
- Tube Insert 3B (Insert, 2,0 ml v2, pembawa sampel (samplecarr.) (24), Qsym, no. kat. 9242083)

## Peralatan untuk real-time PCR

- Instrumen real-time PCR\*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (no. kat. 9002032) atau Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (no. kat. 9002033) dan aksesori yang disediakan
- Menginstal perangkat lunak Rotor-Gene AssayManager® versi 2.1.x (x≥0)
- Menginstal Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in versi 1.0.x (x≥0)
- Profil Uji Kadar ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR yang Diimpor (AP\_ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR\_V2\_0\_x.iap (x≥1))

\* Sebelum digunakan, pastikan instrumen telah diperiksa dan dikalibrasi sesuai dengan rekomendasi produsen.


# Peringatan dan Pencegahan

Perlu diketahui bahwa Anda mungkin diwajibkan untuk berkonsultasi dengan peraturan lokal Anda untuk melaporkan insiden serius yang terjadi sehubungan dengan perangkat pada produsen dan/perwakilan resmi dan otoritas regulasi tempat pengguna dan/atau pasien berada.

## Informasi keselamatan

Saat menangani bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi selengkapnya, periksalah lembar data keselamatan (Safety Data Sheets, SDS) yang sesuai. Dokumen tersedia online dalam format PDF yang nyaman dan ringkas di [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), di mana Anda dapat menemukan, melihat, dan mencetak SDS untuk setiap kit QIAGEN dan komponen kit.

- Spesimen dan sampel berpotensi menular. Buang limbah sampel dan uji kadar sesuai dengan prosedur keselamatan setempat.

<div>PERHATIAN</div> <div></div>	JANGAN menambahkan pemutih atau larutan asam langsung ke sampel atau limbah persiapan.
--	--

## Informasi darurat

CHEMTREC  
Luar AS & Kanada +1 703-527-3887

## Tindakan pencegahan

Penggunaan uji qPCR memerlukan praktik laboratorium yang baik, termasuk pemeliharaan peralatan yang dikhususkan untuk biologi molekuler, serta mematuhi peraturan yang berlaku dan standar relevan.

Kit ini ditujukan untuk penggunaan diagnostik in vitro. Reagen dan petunjuk yang disertakan dalam kit ini telah divalidasi untuk kinerja optimal.

- Pengujian ini digunakan untuk sampel darah utuh yang diberi antikoagulan dengan kalium EDTA (K<sub>2</sub>-EDTA) dan disimpan pada suhu 2–8 °C selama tidak lebih dari 96 jam hingga ekstraksi DNA.
- Semua bahan biologis dan kimia berpotensi bahaya. Spesimen dan sampel berpotensi menginfeksi dan wajib diperlakukan sebagai bahan bahaya biologi.
- Buang limbah sampel dan uji kadar sesuai dengan prosedur keselamatan setempat.
- Reagen untuk *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit diencerkan secara optimal. Jangan mengencerkan reagen lebih lanjut karena hal ini dapat menyebabkan hilangnya kinerja.
- Jangan gunakan volume reaksi (campuran reaksi plus sampel) kurang dari 25 µl.
- Semua reagen yang disediakan dalam *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dimaksudkan untuk digunakan hanya dengan reagen lain yang disediakan dalam kit yang sama. Jangan mengganti reagen apa pun dari satu kit dengan reagen yang sama dari *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit yang lain, bahkan dari batch yang sama, karena ini dapat memengaruhi kinerja.
- Lihat Panduan Pengguna Instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, Panduan Pengguna Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application, Panduan Pengguna Plug-In Gamma, dan panduan pengguna instrumen QIAasymphony SP untuk peringatan, tindakan pencegahan, dan prosedur tambahan.
- Perubahan waktu inkubasi dan suhu dapat menyebabkan data salah atau tidak sesuai.
- Jangan gunakan komponen yang disimpan dengan tidak benar atau kedaluwarsa.
- Campuran reaksi dapat berubah jika terkena cahaya.

- Berhati-hatilah untuk mencegah kontaminasi campuran dengan bahan sintetis yang terkandung dalam reagen JAK2 MT dan JAK2 WT Quant Standards serta dengan reagen JAK2 Mutant dan JAK2 WT Control.
- Berhati-hatilah untuk mencegah kontaminasi sisa produk DNA atau PCR yang dapat mengakibatkan sinyal positif palsu.
- Perhatikan dengan sangat cermat untuk mencegah kontaminasi oleh DNase yang dapat menyebabkan degradasi DNA templat.
- Gunakan pipet khusus yang terpisah untuk menyiapkan campuran reaksi dan menambahkan templat.
- Jangan membuka instrumen Rotor-Gene Q MDx hingga proses pengujian selesai.
- Jangan membuka tabung Rotor-Gene Q setelah proses pengujian selesai.
- Harap berhati-hati untuk memastikan pengujian sampel yang benar dengan perhatikan kesalahan entri sampel, kesalahan pemuatan, dan kesalahan pipet.
- Pastikan sampel ditangani secara sistematis untuk memastikan identifikasi yang benar setiap saat guna menjaga ketertelusuran.
- Oleh karena itu, kami menyarankan hal berikut ini:
  - Gunakan peralatan laboratorium bebas nuklease (misalnya, pipet, ujung pipet, botol reaksi) dan kenakan sarung tangan saat melakukan uji kadar.
  - Gunakan ujung pipet tahan aerosol yang baru untuk semua langkah pemipetan guna menghindari kontaminasi silang pada sampel dan reagen.
  - Siapkan campuran induk pra-PCR dengan bahan khusus (pipet, ujung, dll.) di area khusus di mana tidak ada matriks DNA (DNA, plasmid, atau produk PCR) yang dimasukkan. Tambahkan templat di zona terpisah (sebaiknya di ruangan terpisah) dengan materi spesifik (pipet, ujung, dll.).

Untuk informasi keselamatan yang berkaitan dengan kit ekstraksi QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (no. kat. 61104) dan QIASymphony DNA DSP Mini Kit (no. kat. 937236), silakan lihat buku pegangan terkait.

# Penyimpanan dan Penanganan Reagen

Tanggal kedaluwarsa dan kondisi penyimpanan yang tercetak pada kotak dan label semua komponen harus diperhatikan. Jangan gunakan komponen yang disimpan dengan tidak benar atau kedaluwarsa.

## Kondisi pengiriman

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dikirimkan dalam es kering. Jika ada komponen dari *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (selain enzim) yang tidak beku saat tiba, kemasan luar telah dibuka selama transit, atau pengiriman tidak berisi catatan pengemasan, buku petunjuk, atau reagen, silakan hubungi salah satu Departemen Layanan Teknis QIAGEN atau distributor lokal (lihat sampul belakang atau kunjungi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kondisi penyimpanan

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit harus segera disimpan pada suhu -30 °C hingga -15 °C setelah diterima dalam freezer bersuhu konstan dan terlindung dari cahaya.

Untuk informasi penyimpanan yang berkaitan dengan kit ekstraksi QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (no. kat. 61104) dan QIASymphony DNA DSP Mini Kit (no. kat. 937236), silakan lihat buku pegangan terkait.



## Stabilitas saat penggunaan

Bila disimpan dalam kondisi penyimpanan yang ditetapkan, *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit stabil hingga tanggal kedaluwarsa yang tertera pada label kotak.

Setelah dibuka, reagen dapat disimpan dalam kemasan aslinya pada suhu -30 °C hingga -15 °C hingga 12 bulan. Hindari pencairan dan pembekuan berulang. Jangan melebihi batas maksimum lima siklus beku-cair.

Untuk informasi stabilitas relatif terhadap kit ekstraksi QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (no. kat. 61104) dan QIASymphony DNA DSP Mini Kit (no. kat. 937236), silakan lihat buku pegangan terkait.

- Campur perlahan dengan membalik tabung sebanyak 10 kali dan sentrifugasi semua tabung kecuali enzim sebelum dibuka.
- Tanggal kedaluwarsa untuk setiap reagen ditunjukkan pada label komponen masing-masing. Pada kondisi penyimpanan yang tepat, produk akan mempertahankan kinerjanya selama waktu stabilitas yang tertera pada label tabung dan kotak.
- **Catatan:** Tabung dari batch yang berbeda tidak boleh dicampur. Semua komponen *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit yang digunakan untuk pengujian harus berasal dari batch yang sama. Prosedur kendali mutu pada QIAGEN menggunakan pengujian perilis kit fungsional untuk setiap lot kit individu. Oleh karena itu, jangan mencampur reagen dari kit yang berbeda, meskipun dari lot yang sama.

# Penyimpanan dan Penanganan Spesimen

## Sampel darah utuh

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit digunakan untuk sampel DNA genomik yang diekstraksi dari sampel darah utuh yang diberi antikoagulan dengan kalium EDTA ( $K_2$ -EDTA) yang disimpan sebagai berikut:

- Pada suhu 2–8 °C selama tidak lebih dari 96 jam
- Pada suhu 15–25 °C selama tidak lebih dari 96 jam
- Dibekukan pada suhu -30 hingga -15 °C selama tidak lebih dari 1 bulan

**Catatan:** Perubahan suhu antara penyimpanan di lokasi pengambilan dan pengiriman harus dihindari. Kondisi penyimpanan di lokasi pengujian harus sama dengan pengiriman atau lebih rendah.

Semua sampel harus diperlakukan sebagai bahan yang berpotensi menular. Buang limbah sampel dan uji kadar sesuai dengan prosedur keselamatan setempat.

## Sampel DNA genomik

Setelah DNA genomik diekstraksi, sampel DNA dapat disimpan dan dikirim pada suhu -30 °C hingga -15 °C selama tidak lebih dari 24 bulan. Siklus beku-cair harus dihindari. Jangan melebihi maksimum empat siklus beku-cair.

# Protokol: Ekstraksi dan Persiapan DNA Genomik dari Darah Utuh

## Hal-hal penting sebelum memulai

- DNA genomik harus diekstraksi menggunakan QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (no. kat. 61104) atau instrumen QIAasymphony SP yang dikombinasikan dengan QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (no. kat. 937236).
- Pastikan reagen yang akan digunakan belum kedaluwarsa dan telah diangkut dan disimpan dalam kondisi yang benar.
- **Catatan:** *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit hanya divalidasi dalam kombinasi dengan QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (no. kat. 61104) atau QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (no. kat. 937236). Jangan gunakan produk ekstraksi DNA lain.

## Ekstraksi DNA genomik manual menggunakan QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Ekstraksi DNA genomik manual harus dilakukan dengan QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (no. kat. 61104) sesuai dengan *Buku Pegangan QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit* yang sesuai.

### Menangani reagen

- Saat menyiapkan Wash Buffer untuk protokol ini, selalu campurkan Wash buffer yang telah dilarutkan dengan cara membalik botol beberapa kali sebelum memulai prosedur.
- Gunakan ujung pipet dengan penghalang aerosol saat memipet Elution Buffer dari botol dan pasang kembali tutupnya segera setelah itu untuk menghindari kontaminasi.
- Saat menangani cairan kental, lebih berhati-hatilah dan gunakan pipet yang sesuai untuk memastikan volume yang benar dalam pipet.
- Hindari menyentuh membran kolom putar QIAamp Mini dengan ujung pipet.

-  Jangan menambahkan QIAGEN Protease (QP) langsung ke Lysis Buffer (AL).

## Hal yang perlu dilakukan sebelum memulai

- Seimbangkan sampel darah ke suhu ruangan (15–25 °C), dan pastikan sampel terhomogenasi dengan baik.
- Siapkan Lysis Buffer  
Apabila timbul endapan pada Lysis Buffer (AL), larutkan dengan menginkubasi pada suhu 56 °C.
- Siapkan QIAGEN Protease  
Tambahkan 1,2 ml Pelarut Protease (Protease Solvent, PS) ke vial QIAGEN Protease (QP) yang dibekukan dan campurkan dengan hati-hati. Untuk menghindari cairan berbusa, campurkan dengan membalik vial beberapa kali. Pastikan QIAGEN Protease (QP) sepenuhnya larut.  
**Catatan:** Jangan menambahkan QP langsung ke Lysis Buffer (AL).
- Siapkan Wash Buffer 1  
Menggunakan gelas ukur, tambahkan 25 ml etanol (96–100%) ke dalam botol berisi 19 ml konsentrat Wash Buffer 1 (AW1). Simpan Wash Buffer 1 (AW1) yang dilarutkan pada suhu ruang (15–25 °C).  
**Catatan:** Selalu campur Wash Buffer 1 (AW1) yang dilarutkan dengan membalik botol beberapa kali sebelum memulai prosedur.
- Siapkan Wash Buffer 2  
Menggunakan gelas ukur, tambahkan 30 ml etanol (96–100%) ke dalam botol berisi 13 ml konsentrat Wash Buffer 2 (AW2). Simpan Wash Buffer 2 (AW2) yang dilarutkan pada suhu ruang (15–25 °C).  
**Catatan:** Selalu campur Wash Buffer 2 (AW2) yang dilarutkan dengan membalik botol beberapa kali sebelum memulai prosedur.

- Siapkan Elution Buffer

Satu botol Elution Buffer (AE) disediakan dalam kit. Untuk mencegah kontaminasi Elution Buffer (AE), kami sangat menyarankan penggunaan ujung pipet dengan penghalang aerosol saat memipet Elution Buffer (AE) dari botol dan segera memasang kembali tutup botol setelahnya.

- Setarakan Elution Buffer (AE) ke suhu ruangan (15–25 °C).
- Atur blok pemanas ke 56 °C untuk digunakan pada langkah 4 Prosedur.

## Prosedur

1. Pipet 20 µl QIAGEN Protease (QP) ke tabung lisis (LT).

**Catatan:** Periksa tanggal kedaluwarsa protease yang dilarutkan sebelum digunakan.

2. Tambahkan 200 µl sampel darah ke tabung lisis (LT).
3. Tambahkan 200 µl Lysis Buffer (AL) ke tabung lisis (LT), tutup, dan campur menggunakan vorteks-denyut selama 15 detik.

**Catatan:** Untuk memastikan lisis, sangat penting bahwa sampel dan Lysis Buffer (AL) dicampur secara menyeluruh untuk menghasilkan larutan yang homogen.

**Catatan:** Karena Lysis Buffer (AL) memiliki viskositas tinggi, pastikan Anda menambahkan volume Lysis Buffer (AL) yang tepat dengan memipet secara hati-hati dan menggunakan pipet yang sesuai.



Jangan menambahkan QIAGEN Protease (QP) langsung ke Lysis Buffer (AL).

4. Inkubasi pada suhu 56 °C ( $\pm 1$  °C) selama 10 menit ( $\pm 1$  menit).
5. Sentrifugasi tabung lisis (LT) selama sekitar 5 detik dengan kecepatan penuh untuk menghilangkan tetesan dari bagian dalam tutup.
6. Tambahkan 200 µl etanol (96–100%) ke tabung lisis (LT), tutup, dan aduk rata menggunakan vorteks-denyut selama  $\geq 15$  detik.
7. Sentrifugasi tabung lisis (LT) selama  $\geq 5$  detik dengan kecepatan penuh untuk menghilangkan tetesan cairan dari dalam tutup.

8. Masukkan semua lisat dari langkah 7 dengan hati-hati ke kolom putar QIAamp Mini tanpa membasahi tepiannya. Hindari menyentuh membran kolom putar QIAamp Mini dengan ujung pipet.

**Catatan:** Apabila Anda memproses beberapa sampel, hanya buka satu tabung lisis (LT) pada satu waktu.

9. Tutup kolom putar QIAamp Mini, dan sentrifugasi pada kecepatan sekitar  $6000 \times g$  selama 1 menit. Tempatkan kolom putar QIAamp Mini dalam tabung pencuci bersih (WT), dan buang tabung yang berisi filtrat.


**Catatan:** Jika lisat belum sepenuhnya melewati membran setelah sentrifugasi pada  $6000 \times g$  (8000 rpm), lakukan sentrifugasi lagi pada kecepatan penuh (hingga  $20.800 \times g$ ) selama 1 menit.

**Catatan:** Jika lisat masih tidak melewati membran selama sentrifugasi, buang sampel dan ulangi isolasi dan pemurnian dengan bahan sampel baru.

10. Buka kolom putar QIAamp Mini dengan hati-hati, lalu tambahkan 500  $\mu$ l Wash Buffer 1 (AW1) tanpa membasahi tepiannya. Hindari menyentuh membran kolom putar QIAamp Mini dengan ujung pipet.
11. Tutup kolom putar QIAamp Mini, dan sentrifugasi pada kecepatan sekitar  $6000 \times g$  (8000 rpm) selama 1 menit. Tempatkan kolom putar QIAamp Mini dalam tabung pencuci bersih (WT), dan buang tabung yang berisi filtrat.
12. Buka kolom putar QIAamp Mini dengan hati-hati, lalu tambahkan 500  $\mu$ l Wash Buffer 2 (AW2) tanpa membasahi tepiannya. Hindari menyentuh membran kolom putar QIAamp Mini dengan ujung pipet.
13. Tutup kolom putar QIAamp Mini, dan sentrifugasi pada kecepatan penuh (sekitar  $20.000 \times g$  atau 14.000 rpm) selama 1 menit. Tempatkan kolom putar QIAamp Mini dalam tabung pencuci bersih (WT), dan buang tabung yang berisi filtrat.
14. Sentrifugasi pada kecepatan penuh (sekitar  $20.000 \times g$  atau 14.000 rpm) selama 3 menit untuk mengeringkan membran sepenuhnya.

15. Tempatkan kolom putar QIAamp Mini dalam tabung elusi bersih (ET) dan buang tabung pencucian (WT) yang berisi filtrat. Buka tutup kolom putar QIAamp Mini dengan hati-hati, dan oleskan 50–200 µl Elution Buffer (AE) ke bagian tengah membran. Tutup wadah dan inkubasi pada suhu ruangan (15–25 °C) selama 1 menit. Sentrifugasi pada kecepatan sekitar 6000 x *g* (8000 rpm) selama 1 menit untuk mengeluarkan DNA.
16. Buang tabung sampel, pelat, dan limbah bekas sesuai dengan peraturan keselamatan setempat.


## Ekstraksi DNA Genomik Otomatis Menggunakan QIAasymphony DSP DNA Mini Kit

Ekstraksi DNA genomik otomatis harus dilakukan dengan instrumen QIAasymphony menggunakan modul Persiapan Sampel (SP) yang dikombinasikan dengan QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (no. kat. 937236) dan dengan mengikuti petunjuk dalam *Buku Pegangan QIAasymphony DSP DNA Kit*. Fitur protokol khusus untuk penggunaan dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit disorot dengan tanda  dalam prosedur di bawah ini.

Dengan QIAasymphony SP, QIAasymphony DSP DNA Mini Kit memungkinkan pemurnian DNA otomatis dari darah utuh manusia (menggunakan protokol Blood\_200\_V7\_DSP (atau versi yang lebih baru) pada QIAasymphony SP).

- Tidak diperlukan perawatan awal.
- Tabung dipindahkan langsung ke QIAasymphony SP.
- Pemurnian DNA dilakukan dengan partikel magnetik.

### Hal-hal penting sebelum memulai

-  Volume darah utuh yang akan diekstraksi adalah 300 µl.

### Pengaturan

- Pastikan Anda terbiasa mengoperasikan QIAasymphony SP. Lihat panduan pengguna yang disediakan dengan instrumen Anda untuk petunjuk pengoperasian.



## Menangani reagen

- Sebelum menggunakan kartrij reagen untuk pertama kalinya, periksa apakah Buffer QSL1 dan Buffer QSB1 tidak mengandung endapan. Bila perlu, keluarkan wadah berisi Buffer QSL1 dan Buffer QSB1 dari kartrij reagen lalu inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C sambil sesekali digoyang untuk melarutkan endapan. Pastikan untuk mengganti bak dengan posisi yang benar. Jika kartrij reagen sudah ditusuk, pastikan bak disegel dengan Strip Segel yang Dapat Dipakai Lagi dan inkubasi kartrij reagen lengkap selama 30 menit pada suhu 37 °C dengan sesekali diguncangkan dalam penangas air.
- Sebisa mungkin hindari guncangan kuat pada kartrij reagen (RC) karena buih dapat terbentuk, sehingga dapat menyebabkan masalah deteksi level cairan.

## Pemeliharaan

- Pemeliharaan opsional QIAasympohony SP tidak wajib, tetapi sangat disarankan untuk mengurangi risiko kontaminasi.

## Hal yang perlu dilakukan sebelum memulai

- Sebelum memulai prosedur, pastikan partikel magnet sepenuhnya disuspensi ulang. Lakukan vorteks pada bak yang mengandung partikel magnetik dengan kuat selama minimal 3 menit sebelum penggunaan pertama.
- Pastikan tutup penusuk ditempatkan pada kartrij reagen dan tutup palung partikel magnetik telah dilepas atau, jika menggunakan kartrij reagen yang sudah terpakai sebagian, pastikan Reuse Seal Strips telah dilepas.
- Pastikan untuk membuka tabung enzim.
- Jika sampel diberi barcode, arahkan sampel dalam pembawa tabung sehingga barcode menghadap pembaca barcode di sisi kiri QIAasympohony SP.

## Prosedur

1. Tutup semua laci dan kapnya.
2. Nyalakan QIAasymphony SP, dan tunggu hingga layar "Persiapan Sampel" muncul dan prosedur inisialisasi selesai.

**Catatan:** Sakelar daya terletak di sudut kiri bawah QIAasymphony SP.

3. Login ke instrumen.
4. Pastikan laci "Waste" (Limbah) disiapkan dengan benar, dan lakukan pemindaian inventaris laci "Waste" (Limbah), termasuk saluran pembuangan dan wadah limbah cair. Ganti kantong pembuangan ujung bila perlu.
5. Muat rak elusi yang diperlukan ke dalam laci "Eluate" (Eluat).

**Penting:** Jangan muat pelat 96-sumuran ke "Elution slot 4" (Slot elusi 4).

Hanya gunakan "Elution slot 1" (Slot elusi 1) dengan adaptor pendingin yang sesuai.

**Catatan:** Saat menggunakan pelat 96-sumuran, pastikan pelat berada pada orientasi yang benar karena penempatan yang salah dapat menyebabkan tercampurnya sampel dalam analisis hilir.

6. Muat kartrij reagen dan bahan habis pakai yang diperlukan ke laci "Reagents and Consumables" (Reagen dan Bahan Habis Pakai).

**Catatan:** Pastikan ujung pipet terpasang dengan benar.

7. Lakukan pemindaian persediaan pada laci "Reagents and Consumables" (Reagen dan Bahan Habis Pakai).



8. Pindahkan **300 µl** sampel darah utuh yang akan diekstraksi ke dalam tabung mikro bebas nuklease (2,0 ml Tipe H) dan tempatkan tabung ke dalam adaptor 3b 2 ml di tabung pembawa sampel. Masukkan tabung sampel ke dalam laci "Sample" (Sampel).

9. Dengan menggunakan layar sentuh, masukkan informasi yang diperlukan untuk setiap kumpulan sampel yang akan diproses:

- **Informasi sampel:** Ubah format tabung default. Untuk melakukan ini, klik Select All (Pilih Semua). Kemudian, pilih Sarstedt reference 72.694 (Referensi Sarstedt 72.694) dari lembar Tube Insert (Sisipan Tabung).
- **Protokol yang akan diproses:** Klik Select All (Pilih Semua). Kemudian pada kategori klik DNA Blood (Darah DNA) > Blood\_200\_V7\_DSP (atau versi yang lebih baru) untuk sampel darah utuh.



- **Volume elusi dan posisi output:** 100 µl untuk protokol darah utuh.

**Catatan:** Setelah memasukkan informasi batch, status berubah dari LOADED (DIMUAT) ke QUEUED (ANTRE). Begitu satu batch masuk antrean, tombol Run (Proses) menjadi aktif.

10. Mulai proses.

10a. Untuk memulai proses, klik Run (Proses).

10b. Baca dan konfirmasi pesan yang muncul.

**Catatan:** Kami menyarankan untuk menunggu di samping instrumen hingga instrumen melakukan deteksi level cairan di tabung kontrol internal dan status pembawa QIASymphony SP berubah menjadi RUNNING (MEMPROSES).

**Penting:** Jangan menunda atau menghentikan proses selama pemrosesan (kecuali terjadi keadaan darurat), karena hal ini akan menyebabkan sampel ditandai sebagai "tidak jelas".

**Catatan:** Dimungkinkan untuk memuat sampel secara terus-menerus dan menambahkannya ke proses ini (hingga reagen dimuat).

11. Klik Run (Proses) untuk memulai prosedur pemurnian.

12. Di akhir proses protokol, status batch berubah dari RUNNING (MEMPROSES) menjadi COMPLETED (SELESAI). Ambil rak elusi yang mengandung asam nukleat yang dimurnikan dari laci "Eluate" (Eluat).

Kami merekomendasikan untuk mengeluarkan pelat eluat dari laci “Eluate” (Eluat) segera setelah proses selesai. Tergantung pada suhu dan kelembapan, pelat elusi yang tertinggal pada QIASymphony SP setelah proses selesai dapat mengalami kondensasi atau penguapan.

**Catatan:** Secara umum, partikel magnetik tidak dilimpahkan ke dalam eluat. Jika suatu eluat mengandung partikel hitam, partikel magnetik dapat dihilangkan sebagai berikut:

- 12a. Tempelkan tabung berisi DNA ke pemisah magnetik yang sesuai (misalnya, QIAGEN 12-Tube Magnet, no. kat. 36912) hingga partikel magnetik terpisah.
- 12b. Jika DNA berada dalam pelat mikro, tempelkan pelat mikro ke pemisah magnetik yang sesuai (misalnya, QIAGEN 96-Well Magnet Type A, no. kat. 36915) hingga partikel magnetik terpisah. Jika tidak tersedia pemisah magnetik yang sesuai, sentrifugasi tabung yang berisi DNA selama 1 menit pada kecepatan penuh dalam mikrosentrifus untuk memisahkan partikel magnetik yang tersisa.
13. Ekspor file hasil QIASymphony SP: laporan ini dibuat untuk setiap pelat elusi.
  - 13a. Masukkan stik USB ke salah satu port USB di bagian depan QIASymphony SP.
  - 13b. Klik Tools (Peralatan).
  - 13c. Pilih File Transfer (Transfer File).
  - 13d. Di tab File In-/Output, klik Result File (File Hasil) > Transfer.  
Nama file yang diekspor harus memiliki format berikut:  
###-bb-hhjj:mm:dd\_ID rak Elution
14. Periksa kolom “Validity of result” (Validitas hasil) untuk setiap sampel pada file hasil QIASymphony SP.
  - **Status valid dan tidak jelas:** Lanjutkan ke Kualifikasi dan kuantifikasi DNA (Kualifikasi dan kuantifikasi DNA).
  - **Status tidak valid:** Sampel ditolak. Proses ulang langkah ekstraksi.
15. Jika kartrij reagen hanya dipakai sebagian, segel dengan Strip Segel yang Dapat Dipakai Lagi yang disediakan dan tutup tabung yang berisi proteinase K dengan sumbat ulir segera setelah akhir proses protokol untuk menghindari penguapan.

16. Buang tabung sampel, pelat, dan limbah bekas sesuai dengan peraturan keselamatan setempat.
17. Bersihkan QIASymphony SP.  
Ikuti petunjuk pemeliharaan dalam manual pengguna yang disediakan dengan instrumen Anda. Pastikan untuk membersihkan pelindung ujung secara rutin untuk meminimalkan risiko kontaminasi silang.
18. Tutup laci instrumen, dan nonaktifkan QIASymphony SP.

## Kualifikasi dan kuantifikasi DNA

ATE kosong atau dapar AE harus digunakan untuk mengkalibrasi spektrofotometer. Penggunaan dapar ini diperlukan karena dapar elusi yang digunakan dalam kit ekstraksi DNA genomik mengandung bahan pengawet natrium azida yang menyerap pada panjang gelombang 260 nm.

- Rasio  $A_{260}/A_{280}$  harus  $\geq 1,7$  karena rasio yang lebih kecil biasanya menunjukkan kontaminasi protein atau adanya bahan kimia organik dan memengaruhi langkah PCR.
- Jumlah DNA ditentukan dengan mengukur kerapatan optik pada 260 nm.
- Jumlah total DNA yang dimurnikan = konsentrasi x volume sampel dalam  $\mu\text{l}$ .
- Jika rasio  $A_{260}/A_{280}$  di bawah 1,7 dan/atau jika konsentrasi DNA genomik di bawah 10 ng/ $\mu\text{l}$ , sampel tidak boleh diproses lebih lanjut.

## Normalisasi sampel DNA genomik

DNA harus diencerkan menjadi 10ng/ $\mu\text{l}$  dalam dapar TE yang disediakan dalam *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Setiap reaksi PCR pada Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dioptimalkan untuk 50 ng DNA genomik murni yang diencerkan dalam volume sampel akhir 5  $\mu\text{l}$ . Total 100 ng per sampel yang diuji diperlukan untuk melakukan reaksi mutan dan tipe liar.

# Protokol: qPCR pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

## Hal-hal penting sebelum memulai

- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit harus dijalankan pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM menggunakan Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit secara khusus memerlukan Plug-in Gamma. Plug-in ini dapat diunduh dari situs web QIAGEN: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Plug-in ini harus diinstal pada komputer yang telah menginstal Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit juga memerlukan profil uji kadar. Profil uji kadar ini (file .iap) berisi semua parameter yang diperlukan untuk siklus dan analisis uji kadar qPCR. Profil dapat diunduh dari halaman web yang didedikasikan untuk *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit di situs web QIAGEN: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Profil uji kadar harus diimpor ke perangkat lunak Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- Luangkan waktu untuk mempelajari instrumen Rotor-Gene Q MDx sebelum memulai protokol. Lihat panduan pengguna untuk instrumen tersebut, Rotor-Gene AssayManager v2.1 dan Plug-in Gamma, untuk detailnya.
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 memungkinkan interpretasi otomatis pada hasil PCR. Parameter siklus terkunci untuk proses.

## Pengaturan

- Unduh dan instal Rotor-Gene AssayManager v2.1. Lihat “Penginstalan perangkat lunak inti Rotor-Gene AssayManager v2.1”, halaman 40 untuk informasi lebih detail.
- Unduh dan instal plug-in Gamma. Lihat “Penginstalan Plug-in Gamma dan pengimporan profil uji kadar”, halaman 41 untuk informasi lebih rinci.
- Kami merekomendasikan pengujian delapan sampel DNA genomik dalam percobaan yang sama untuk mengoptimalkan penggunaan kontrol, standar, dan campuran reaksi. Lihat “Pemrosesan sampel pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dengan rotor 72 tabung”, halaman 44 untuk informasi lebih detail.

## Penginstalan perangkat lunak inti Rotor-Gene AssayManager v2.1

Perangkat lunak Rotor-Gene AssayManager v2.1 harus diinstal pada komputer yang terhubung ke instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dan dapat diunduh dari situs web QIAGEN: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Untuk detail tentang penginstalan perangkat lunak inti Rotor-Gene AssayManager v2.1, termasuk persyaratan komputer, silakan lihat *Panduan Pengguna Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

**Catatan:** *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit hanya dapat memproses pengujian ketika pengaturan konfigurasi tertentu dalam perangkat lunak Rotor-Gene AssayManager v2.1 diprogram.

Demi keamanan proses di seluruh sistem, pengaturan konfigurasi yang diperlukan berikut harus ditetapkan untuk mode tertutup:

- Nomor material yang dibutuhkan
- Tanggal kedaluwarsa yang valid diperlukan
- Nomor lot diperlukan



## Penginstalan Plug-in Gamma dan pengimporan profil uji kadar

Penginstalan dan pengimporan Plug-in Gamma dan profil uji kadar dirinci dalam *Panduan Pengguna Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* dan *Panduan Pengguna Plug-in Gamma*.

### Untuk menginstal Plug-in Gamma

1. Unduh Plug-in Gamma dan versi terbaru profil uji kadar *ipsogen* JAK2 CE IVDR dari situs web QIAGEN.
2. Klik dua kali pada file RGAM\_V2\_1\_Gamma\_Plug-in.Installation.V1\_0\_x.msi (di mana  $x \geq 0$ ). Ikuti petunjuk penginstalan.


Untuk deskripsi terperinci mengenai proses ini, baca bagian “Memasang Plug-in” di *Panduan Pengguna Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

**Catatan:** Untuk keamanan proses di seluruh sistem, klik tab Settings (Pengaturan) dan centang kotak untuk Nomor material yang diperlukan, Tanggal kedaluwarsa yang valid diperlukan, dan Nomor lot diperlukan untuk mode tertutup (bagian Daftar pekerjaan). Jika ini tidak diaktifkan (dicentang), klik untuk mengaktifkan.

3. Setelah penginstalan plug-in berhasil, pengguna dengan hak Administrator untuk perangkat lunak Rotor-Gene AssayManager v2.1 perlu mengimpor profil uji kadar *ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR*.

### Untuk mengimpor profil uji kadar *ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR*



1. Klik ikon  untuk Rotor-Gene AssayManager v2.1 untuk membuka perangkat lunak.
2. Masuk sebagai pengguna dengan hak Administrator dalam mode Closed (Tertutup) (Gambar 3).  
Jendela login terbuka (Gambar 4).



## Rotor-Gene AssayManager

2.1.0.7

User ID

Password

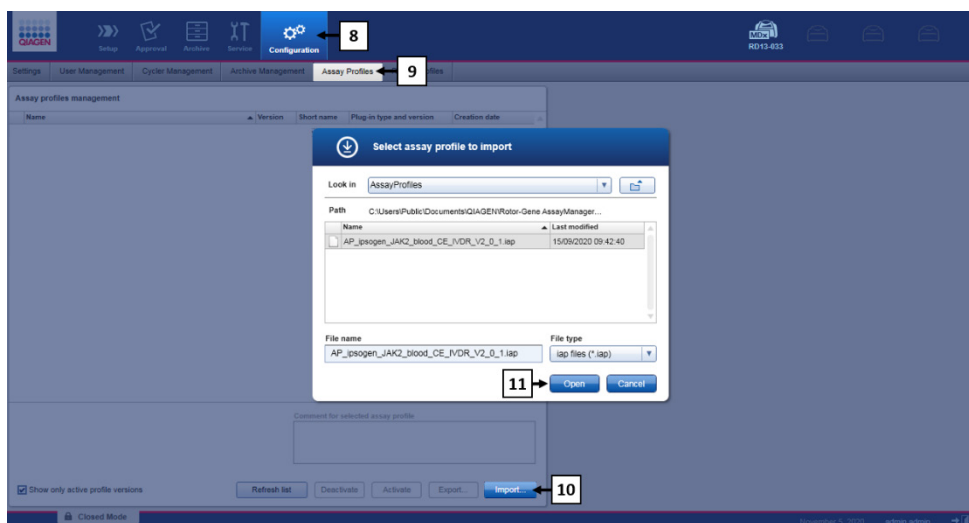
Mode  
Closed

OK Cancel

Gambar 3. Jendela login Rotor-Gene AssayManager. 1: Mode Closed (Tertutup).

Gambar 4. Rotor-Gene AssayManager v.2.1. 2: Halaman Setup (Pengaturan). Digunakan untuk pembuatan, manajemen, dan aplikasi daftar kerja. 3: Lingkungan Approval (Persetujuan). Digunakan untuk mencari eksperimen yang belum dirilis atau yang dirilis sebagian dan untuk persetujuan sampel khusus. Laporan eksperimen dibuat saat rilis sampel. 4: Lingkungan Archive (Arsip). Digunakan untuk mencari eksperimen yang dirilis penuh dan dirilis sebagian dan untuk membuat laporan eksperimen menggunakan profil laporan yang ditentukan sebelumnya. 5: Lingkungan Service (Layanan). Berisi tab Audit Trail (Jejak Audit) dan Re-usable Data (Data yang Dapat Digunakan Kembali). 6: Konfigurasi. Digunakan untuk menyesuaikan pengaturan Rotor-Gene AssayManager. 7: Ikon Rotor-Gene Q. Digunakan untuk menghentikan atau menyelesaikan suatu putaran dan merilis cyclers setelah satu proses selesai (dan untuk memeriksa sambungan instrumen).

3. Klik lingkungan Configuration (Konfigurasi) (Gambar 4, kotak 6) (Gambar 5, kotak 8).
4. Klik tab Assay Profiles (Profil Uji Kadar) (Gambar 5, kotak 9).
5. Klik Import (Impor) (Gambar 5, kotak 10).
6. Pada kotak dialog Select assay profile to import (Pilih profil uji kadar untuk diimpor), pilih profil uji kadar ipsogen\_JAK2\_blood\_CE\_IVDR. Klik Open (Buka) (Gambar 5, kotak 11).



**Gambar 5. Impor profil uji kadar.** 8: Lingkungan Configuration (Konfigurasi), 9: Tab Assay profile (Profil uji kadar), 10: Tombol Import (Impor), 11: Tombol Open (Buka).

7. Setelah profil uji kadar berhasil diimpor, profil tersebut dapat digunakan di lingkungan Setup (Pengaturan) (Gambar 4, kotak 2).

**Catatan:** Versi profil uji kadar yang sama tidak dapat diimpor dua kali.

## Pemrosesan sampel pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dengan rotor 72 tabung

Kami merekomendasikan pengujian delapan sampel DNA genomik dalam percobaan yang sama untuk mengoptimalkan penggunaan kontrol, standar, dan campuran reaksi.

Tabel 3 menyediakan jumlah reaksi yang dapat diproses menggunakan rotor 72 tabung.

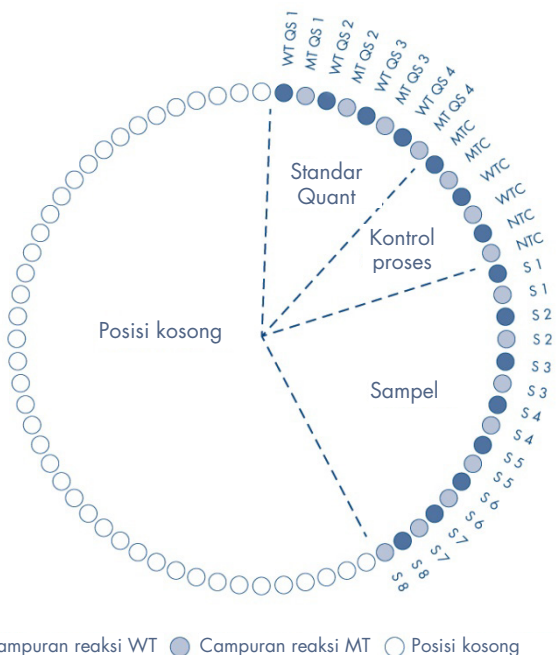
Skema yang ditunjukkan pada Gambar 6 menyediakan contoh blok pemuatan dan pengaturan rotor untuk percobaan dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Angka menunjukkan posisi dalam blok pemuatan dan menunjukkan posisi akhir rotor.

**Tabel 3. Jumlah reaksi untuk instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dengan rotor 72 tabung**

Sampel	Jumlah reaksi
<b>Dengan Campuran Reaksi JAK2 MT</b>	
8 sampel DNA genomik	8
JAK2 MT Quant Standards (mutan)	4
JAK2 MT Control (mutan)	1
JAK2 WT Control (tipe liar)	1
Air tanpa kontrol templat (no template control, NTC)	1
<b>Dengan Campuran Reaksi JAK2 WT</b>	
8 sampel DNA genomik	8
JAK2 WT Quant Standards (tipe liar)	4
JAK2 MT Control (mutan)	1
JAK2 WT Control (tipe liar)	1
Air untuk NTC	1

1	WT QS 1	9	MTC	17	S 2	25	S 6	33		41		49		57		65	
2	MT QS 1	10	MTC	18	S 2	26	S 6	34		42		50		58		66	
3	WT QS 2	11	WTC	19	S 3	27	S 7	35		43		51		59		67	
4	MT QS 2	12	WTC	20	S 3	28	S 7	36		44		52		60		68	
5	WT QS 3	13	NTC	21	S 4	29	S 8	37		45		53		61		69	
6	MT QS 3	14	NTC	22	S 4	30	S 8	38		46		54		62		70	
7	WT QS 4	15	S 1	23	S 5	31		39		47		55		63		71	
8	MT QS 4	16	S 1	24	S 5	32		40		48		56		64		72	



**Gambar 6. Pengaturan pelat dan rotor untuk percobaan dengan ipsogen JAK2 RGG PCR Kit.** WTC: JAK2 WT Control; MTC: JAK2 mutan (mutant, MT) Control; WT-QS: JAK2 WT Quant standards; MT-QS: JAK2 MT Quant Standards; S: sampel DNA genomik; NTC: kontrol tanpa templat (air).



Tabung harus dimasukkan ke dalam rotor seperti yang ditunjukkan di Gambar 6 karena rangkaian analisis otomatis dalam profil uji kadar didasarkan pada pengaturan ini. Jika tata letak yang berbeda digunakan, hasil yang tidak normal akan diperoleh.

**Catatan:** Semua posisi yang tidak terpakai harus terisi dengan tabung strip berpenutup kosong.

## qPCR pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dengan rotor 72 tabung

Hal yang perlu dilakukan sebelum memulai:

- Buat daftar kerja untuk sampel yang akan diproses.

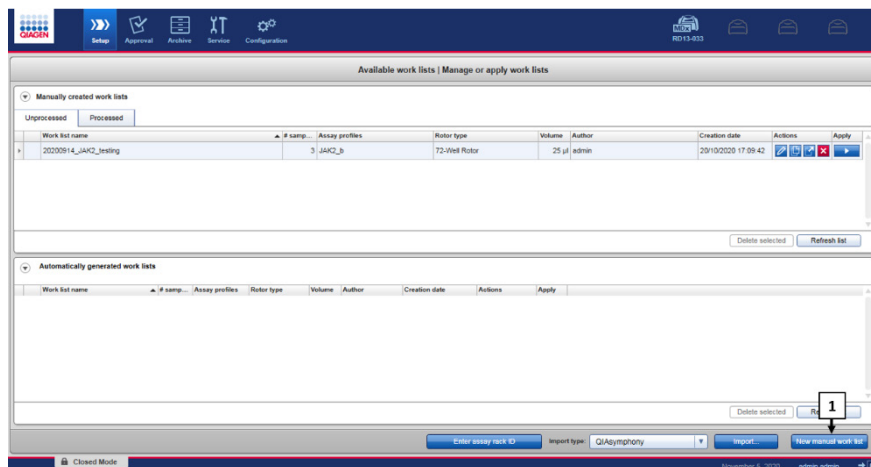
### Untuk membuat daftar kerja

1. Nyalakan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
2. Buka perangkat lunak Rotor-Gene AssayManager v2.1 dan masuk sebagai pengguna dengan peran operator dalam mode Closed (Tertutup) (Gambar 3, kotak 1).
3. Periksa apakah instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM terdeteksi dengan benar oleh perangkat lunak sebelum memulai proses (Gambar 7).



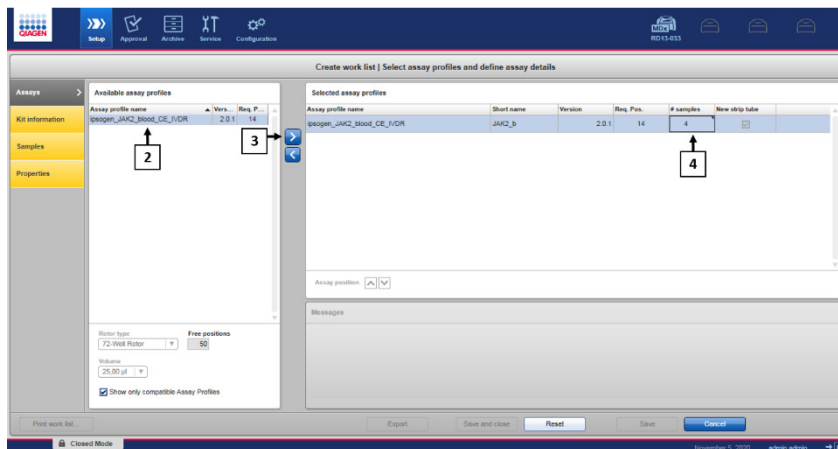
Gambar 7. Status koneksi Rotor-Gene Q.

4. Klik “New manual work list” (Daftar kerja manual baru) di lingkungan Setup (Pengaturan) (Gambar 8, kotak 1).



Gambar 8. Pembuatan daftar kerja. 1: Tombol pembuatan daftar kerja baru.

5. Pilih profil uji kadar “ipsogen\_JAK2\_darah\_CE\_IVDR” dari daftar profil uji kadar yang tersedia pada langkah “Assay” (Uji Kadar) (Gambar 9, kotak 2).



**Gambar 9. Pembuatan daftar kerja – Pemilihan Profil Uji Kadar.** 2: Profil uji kadar yang tersedia. 3: Transfer profil uji kadar ke daftar kerja. 4: Masukkan jumlah sampel.

6. Klik “>” untuk mentransfer profil uji kadar yang dipilih ke daftar “Selected assay profiles” (Profil uji kadar terpilih) (Gambar 9, kotak 3). Profil uji kadar sekarang harus ditampilkan di daftar “Selected assay profiles” (Profil uji kadar terpilih).
7. Masukkan jumlah sampel di kolom yang sesuai (Gambar 9, kotak 4).
8. Klik langkah “Kit Information” (Informasi Kit) dan masukkan informasi kit JAK2 berikut secara manual, yang tercetak pada tutup kotak:
- Nomor material 1120216 (Gambar 10, kotak 6)
  - Tanggal kedaluwarsa yang valid (Gambar 10, kotak 7)
  - Nomor lot (Gambar 10, kotak 8)

**Catatan:** Atau, kode batang kit (Gambar 10, kotak 5) dapat dimasukkan atau dipindai.

**Catatan:** Semua kolom harus diisi. Kolom akan berubah menjadi biru jika informasi yang dimasukkan valid (misalnya, perlengkapan belum kedaluwarsa, material dan nomor lot yang dimasukkan valid).



**Assays**

**Kit information**

ipsogenJAK2\_blood\_CE\_IVDR

☐ Use kit bar code

☒ Enter kit information manually

**Kit information**

Kit bar code

Material number: 1120216

Kit expiry date: 30/11/2020

Lot number: 10795318

**Gambar 10. Pembuatan daftar kerja - Memasukkan Informasi kit.** 5: Kode batang kit (dapat dipindai atau dimasukkan secara manual; jika kode batang dimasukkan, kolom lainnya akan terisi secara otomatis). 6: Nomor material. 7: Tanggal kedaluwarsa kit. 8: Nomor lot. Informasi ini tersedia di kotak kit.

## 9. Klik langkah “Samples” (Sampel).

Daftar dengan detail sampel akan ditunjukkan. Daftar ini mewakili tata letak rotor yang diperkirakan.

## 10. Masukkan nomor identifikasi sampel (ID) (Gambar 11, kotak 9) dalam daftar ini serta informasi sampel opsional (Gambar 11, kotak 10) sebagai komentar untuk setiap sampel.

**Assays**

**Kit information**

**Samples**

**Properties**

**Create work list | Edit samples**

Pos	Style	Sample ID	Status	Sample type	Targets	Assay	Sample comment
2		Q52	QS		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	
3		Q53	QS		FAM_VT_HEX_VT	JAK2_b	
4		Q53	QS		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	
5		Q53	QS		FAM_VT_HEX_VT	JAK2_b	
6		Q54	QS		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	
7		Q54	QS		FAM_VT_HEX_VT	JAK2_b	
8		Q54	QS		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	
9		MasterControl	PC		FAM_VT_HEX_VT	JAK2_b	
10		WbTypeControl	PC		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	
11		WbTypeControl	PC		FAM_VT_HEX_VT	JAK2_b	
12		NTC	NTC		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	
13		NTC	NTC		FAM_VT_HEX_VT	JAK2_b	
14		Sample 1	Test		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	
15		Sample 1	Test		FAM_VT_HEX_VT	JAK2_b	
16		Sample 2	Test		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	
17		Sample 2	Test		FAM_VT_HEX_VT	JAK2_b	
18		Sample 3	Test		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	
19		Sample 3	Test		FAM_VT_HEX_VT	JAK2_b	
20			Test		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	
21			Test		FAM_VT_HEX_VT	JAK2_b	
22			Test		FAM_MF_HEX_MF	JAK2_b	

**Gambar 11. Pembuatan daftar kerja Memasukkan informasi sampel.** 9: ID Sampel. 10: Komentar sampel (opsional)

11. Klik langkah “Properties” (Properti). Masukkan nama daftar kerja (Gambar 12, kotak 11).
12. Periksa kotak “work list is complete (can be applied)” (daftar kerja sudah lengkap (bisa diterapkan) (Gambar 12, kotak 12).

**Gambar 12. Pembuatan daftar kerja – Properti.** 11: Nama daftar kerja. 12: Centang opsi “work list is complete” (daftar kerja sudah selesai). 13: Hapus centang pada kotak “is editable” (dapat diedit) hanya jika daftar kerja tidak akan diubah.

**Catatan:** Kotak centang “is editable” (dapat diedit) (Gambar 12, kotak 13) menentukan apakah daftar kerja masih dapat diedit atau tidak. Jika daftar kerja berlaku dan tidak akan diubah setelahnya, hapus kotak centang is editable (dapat diedit).

13. Simpan daftar kerja.
14. Daftar kerja dapat dicetak dan hal ini dapat membantu penyiapan dan pengaturan qPCR. Untuk mencetak daftar kerja, klik “Print work list” (Cetak daftar kerja). Detail sampel disertakan sebagai bagian dari daftar kerja ini.

**Catatan:** Daftar kerja dapat disimpan dan diproses kemudian, atau dapat dibuat saat memuat eksperimen dalam instrumen dan diterapkan secara langsung.

Prosedur

Menyiapkan percobaan qPCR

- 1. Cairkan semua komponen yang diperlukan kecuali polimerase DNA *Taq*, yang harus disimpan di dalam freezer saat tidak digunakan. Letakkan tabung yang berisi komponen yang akan dicairkan di atas es.

**Penting:** Jangan melebihi 30 menit untuk langkah pencairan guna menghindari degradasi material.

- 2. Bersihkan area meja kerja yang dikhususkan untuk persiapan campuran PCR guna memastikan tidak ada kontaminasi templat atau nuklease.
- 3. Campur perlahan tabung yang berisi standar, kontrol, dan campuran reaksi dengan cara membaliknya 10 kali, lalu sentrifugasi sebentar sebelum digunakan.
- 4. Siapkan campuran master qPCR berikut sesuai dengan jumlah sampel yang akan diproses.

**Catatan:** Semua konsentrasi adalah untuk volume akhir reaksi.

Tabel 4 dan Tabel 5 menjelaskan skema pipet untuk persiapan satu campuran reagen MT dan satu campuran reagen WT, yang dihitung untuk mencapai volume reaksi akhir sebesar 25 µl. Volume tambahan disertakan untuk mengimbangi kesalahan pipet dan untuk menampung 8 sampel serta kontrol.

Tabel 4. Persiapan campuran master qPCR untuk deteksi sekuens MT JAK2

Komponen	1 reaksi (µl)	15 + 1* reaksi (µl)	Konsentrasi akhir
JAK2 MT Reaction Mix (Campuran Reaksi JAK2 MT)	19,8	316,8	1x
<i>Taq</i> DNA polymerase (Polimerase DNA <i>Taq</i> )	0,2	3,2	1x
Sampel (akan ditambahkan pada langkah 6)	5	masing-masing 5	–
Total volume	25	masing-masing 25	–

\* Volume reaksi tambahan disertakan sebagai volume mati.

Tabel 5. Persiapan campuran master qPCR untuk deteksi sekuens WT JAK2

Komponen	1 reaksi (µl)	15 + 1* reaksi (µl)	Konsentrasi akhir
JAK2 WT Reaction Mix (Campuran Reaksi JAK2 WT)	19,8	316,8	1x
Taq DNA polymerase (Polimerase DNA Taq)	0,2	3,2	1x
Sampel (akan ditambahkan pada langkah 6)	5	masing-masing 5	–
Total volume	25	masing-masing 25	–

\* Volume reaksi tambahan disertakan sebagai volume mati.

**Penting:** Lakukan vorteks dan sentrifugasi sebentar pada campuran master qPCR sebelum memasukkan 20 µl ke dalam setiap tabung strip.

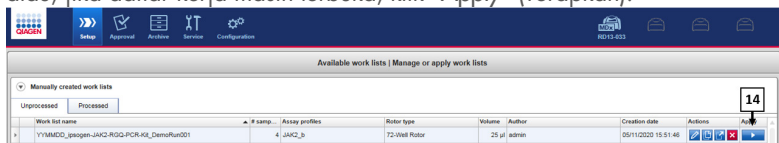
5. Tambahkan kontrol tanpa templat air (no template control, NTC) ke dalam tabung yang sesuai dan tutup.
6. **Penting:** Lakukan vorteks dan sentrifugasi sebentar pada DNA (sampel DNA genomik ditambah QS dan kontrol). Kemudian, tambahkan 5 µl bahan yang akan diukur volumenya ke dalam tabung strip yang sesuai hingga mencapai volume total 25 µl. Campurkan perlahan dengan pemipetan naik dan turun.

**Catatan:** Berhati-hatilah saat mengganti ujung di antara setiap tabung guna menghindari kontaminasi templat atau campuran reaksi yang tidak spesifik dan, oleh karena itu, hasil positif palsu. Mulailah dengan menambahkan sampel uji, lalu standar dan kontrol.

7. Kembalikan semua komponen *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit ke freezer untuk menghindari degradasi material.

## Memulai proses

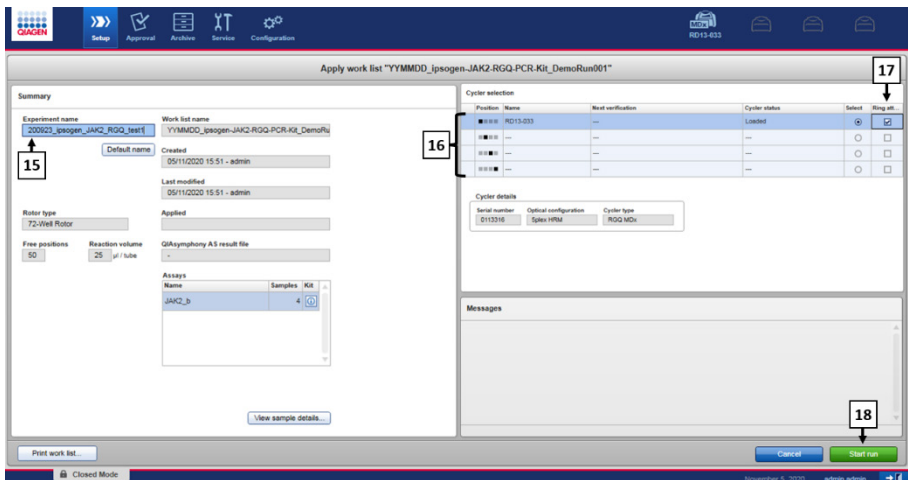
1. Siapkan Rotor-Gene Q MDx, dan mulai prosesnya sebagai berikut.
  - 1a. Tempatkan rotor 72 sumuran padaudukan rotor untuk Rotor-Gene Q MDx.
  - 1b. Isi rotor dengan tabung strip sesuai dengan posisi yang ditentukan, dimulai dari posisi 1, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6 (halaman 45), dengan tabung strip kosong yang ditutup ditempatkan pada semua posisi yang tidak digunakan.  
**Catatan:** Pastikan tabung pertama dimasukkan ke posisi 1 dan tabung strip ditempatkan pada orientasi dan posisi yang benar, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6.
  - 1c. Pasang ring penguncian.
  - 1d. Muat instrumen Rotor-Gene Q MDx dengan rotor dan cincin pengunci, lalu tutup penutup instrumen.
  - 1e. Dalam perangkat lunak Rotor-Gene AssayManager v2.1, pilih daftar kerja yang sesuai dari manajer daftar kerja dan klik “Apply” (Terapkan) (Gambar 13, kotak 14) atau, jika daftar kerja masih terbuka, klik “Apply” (Terapkan).



**Gambar 13. Penyiapan proses - Pemilihan daftar kerja.** 14: Tombol Apply (Terapkan).

**Catatan:** Jika daftar kerja khusus percobaan belum dibuat, masuk ke Rotor-Gene AssayManager v2.1 dan ikuti proses di “Untuk membuat daftar kerja” (Untuk membuat daftar kerja), halaman 47 sebelum melanjutkan sebagai berikut.

- Masukkan nama eksperimen (Gambar 14, kotak 15).
- Pilih cycler yang akan digunakan di daftar “Cycler selection” (Pemilihan cycler) (Gambar 14, kotak 16).
- Periksa pemasangan cincin pengunci yang benar dan konfirmasi pada layar bahwa cincin pengunci terpasang (Gambar 14, kotak 17).
- Klik “Start run” (Mulai proses) (Gambar 14, kotak 18).



**Gambar 14. Penyiapan proses – Pengaturan proses.** 15: Nama eksperimen. 16: Pemilihan cycler. 17: Periksa dan pastikan cincin pengunci terpasang. 18: Tombol mulai proses.

1f. Proses PCR JAK2 RGQ harus dimulai.

## Mengakhiri, merilis, dan menyetujui proses

1. Ketika proses selesai, klik “Finish run” (Selesaikan proses).

**Catatan:** Hingga tahap ini selesai, eksperimen tidak disimpan dalam basis data internal.

**Catatan:** Analisis data yang diperoleh dilakukan secara otomatis tergantung pada plug-in yang sesuai dengan profil uji kadar dan aturan serta nilai parameter yang ditentukan oleh profil uji kadar.

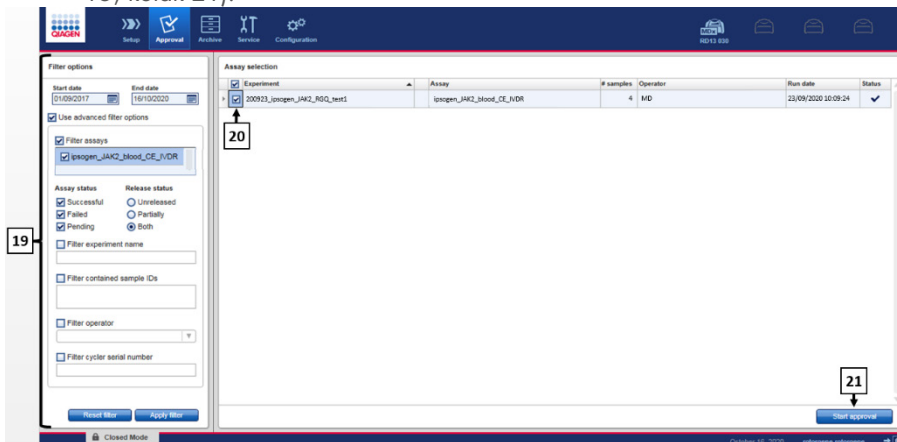
2. Rilis dan setujui proses.

- Untuk pengguna yang masuk dengan peran Pemberi Persetujuan, klik **“Release and go to approval”** (Rilis dan lanjutkan ke persetujuan).
- Untuk pengguna yang masuk dengan peran Operator, klik **“Release”** (Rilis).

**Catatan:** Fungsi umum lingkungan Approval (Persetujuan) dijelaskan dalam Panduan Pengguna Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in.

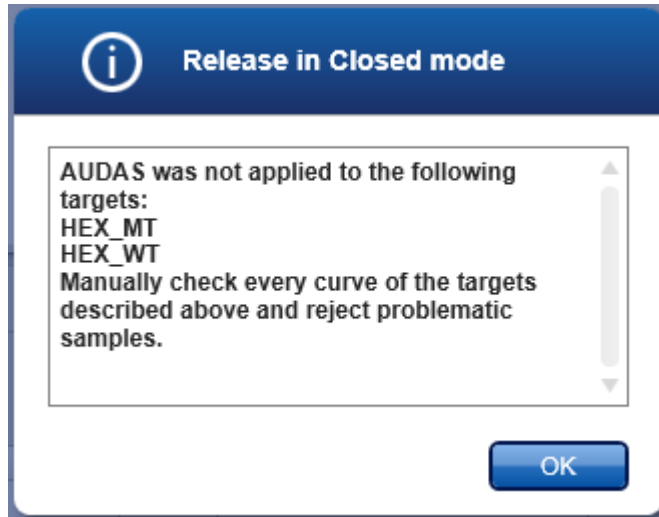
### 3. Hasil rilis.

- Jika “Release and go to approval” (Rilis dan lanjutkan ke persetujuan) diklik, hasil percobaan akan ditampilkan di lingkungan “Approval” (Persetujuan).
- Jika “Release” (Rilis) diklik, pengguna dengan peran “Pemberi Persetujuan” perlu masuk dan memilih lingkungan “Persetujuan”.
- Terapkan opsi filter (Gambar 15, kotak 19) untuk memilih percobaan yang akan disetujui (Gambar 15, kotak 20). Kemudian, klik “Apply” (Terapkan) (Gambar 15, kotak 21).



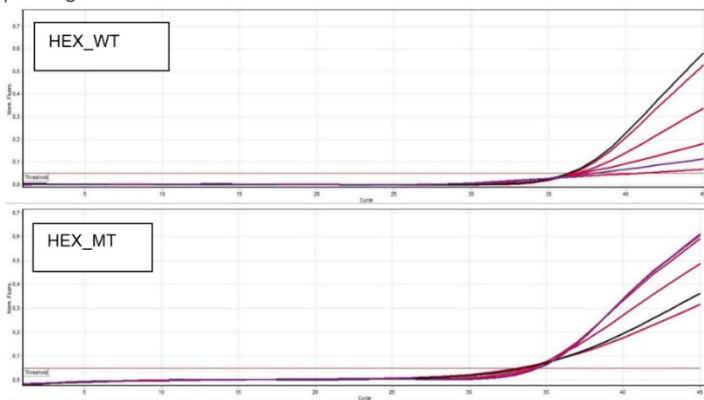
**Gambar 15. Persetujuan proses - Pemilihan percobaan.** 19: Opsi filter. 20: Pemilihan uji kadar. 21: Tombol Start approval (Mulai persetujuan).

- Peringatan AUDAS (Pemindaian Data Otomatis) berikut muncul (Gambar 16). Di bagian “Plot dan Informasi”, periksa secara manual kurva fluoresens target HEX untuk anomali (misalnya, lonjakan yang disebabkan oleh kesalahan perangkat keras).



Gambar 16. Peringatan AUDAS.

**Catatan:** Kurva target HEX kontrol internal tidak menunjukkan bentuk sigmoid yang khas (seperti pada kurva contoh di Gambar 17) dan harus dianggap sebagai kurva yang valid. Harap perhatikan bahwa semua kriteria validitas kontrol internal lainnya (misalnya, batas  $C_T$ ) diperiksa secara otomatis oleh perangkat lunak.



Gambar 17. Kurva HEX Kontrol Internal.






Hasil sampel uji dianalisis secara otomatis oleh Rotor-Gene AssayManager v2.1 tetapi harus disetujui dan dirilis oleh pengguna yang masuk dengan peran sebagai pemberi persetujuan. Awalnya, semua sampel uji dari percobaan yang telah selesai memiliki status "Undefined" (Tidak ditentukan). Contoh hasil yang akan disetujui memiliki tiga tombol persetujuan di akhir baris khusus. Tombol-tombol ini digunakan untuk menerima atau menolak hasil sampel secara interaktif (Gambar 18 dan Gambar 19).

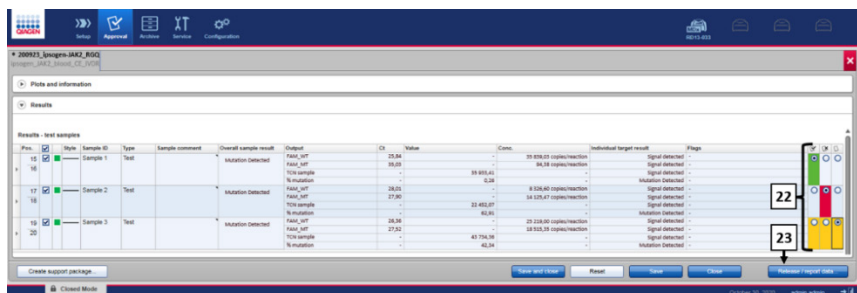
**Catatan:** Sampel yang dilaporkan sebagai "INVALID" (TIDAK VALID) oleh Rotor-Gene AssayManager v2.1 tidak dapat ditetapkan ulang sebagai "VALID" meskipun hasil sampel ditolak.

**Catatan:** Sampel harus ditolak jika pengguna tidak setuju dengan hasilnya dan ingin menguji ulang (misalnya, jika anomali diamati pada kurva target HEX kontrol internal).

- Hasil ulasan (Gambar 19, kotak 22) dan klik "Release/Report data" (Rilis/Laporkan data) (Gambar 19, kotak 23).

Background color	Status of test sample
	Undefined
	Accepted
	Rejected

**Gambar 18. Contoh definisi status persetujuan.**



**Gambar 19. Rilis dan laporkan data.** 22: Tombol persetujuan sampel (untuk menyetujui (✓) atau menolak hasil (✗) untuk setiap sampel). 23: Tombol rilis dan laporkan data.

- Masukkan kata sandi jika diperlukan, centang kotak “Create report” (Buat laporan) dan klik “OK” (Gambar 20, kotak 24 dan 25). Laporan akan dibuat dalam format .pdf dan otomatis disimpan dalam folder yang telah ditentukan sebelumnya.

Jalur folder default-nya adalah:

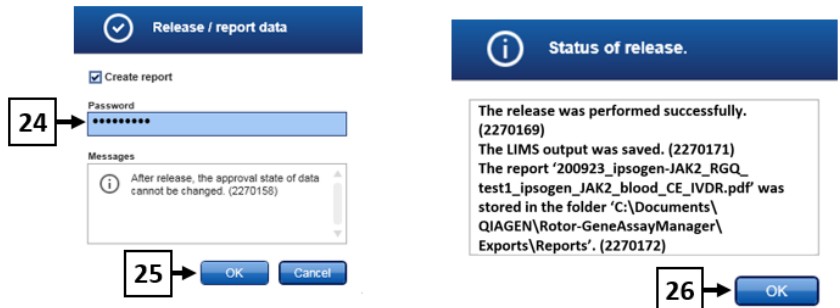
C: > Users > Public > Documents > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

**Catatan:** Jalur dan folder ini dapat diubah di lingkungan Konfigurasi.

- Di saat yang sama, file LIMS secara otomatis dibuat dan disimpan dalam folder yang telah ditentukan sebelumnya. Jalur folder default-nya adalah: C: > Users > Public > Documents > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > LIMS.

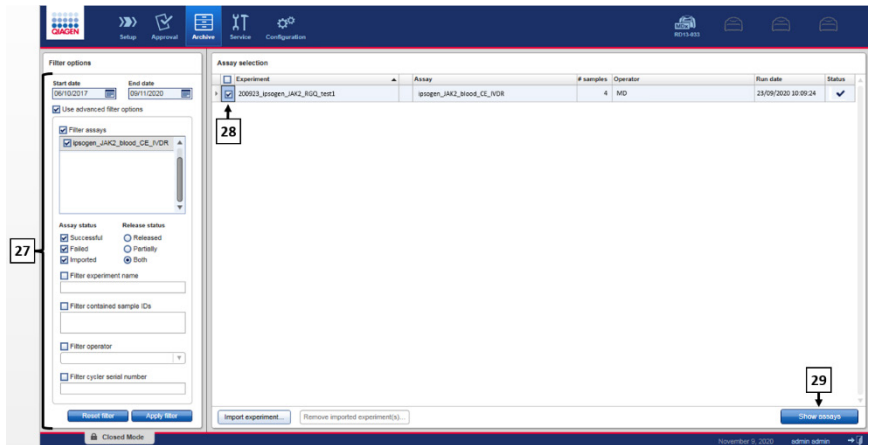
**Catatan:** Jalur dan folder ini dapat diubah di lingkungan “Konfigurasi”.

- Tutup file pdf dan kembali ke Rotor-Gene AssayManager. Klik “OK” ketika diminta (Gambar 20, kotak 26).



**Gambar 20. Rilis dan laporkan data.** 24: Kata sandi pengguna. 25-26: Tombol OK untuk memilih.

- Setelah memasukkan kata sandi pengguna, laporan PDF dibuat dan dibuka. Tutup laporan PDF. Sebuah file LIMS kemudian dibuat secara otomatis, dan pernyataan pelepasan muncul. Klik “OK”. Uji Kadar ini sekarang telah dirilis sepenuhnya. Klik “OK” untuk menuju ke lingkungan “Arsip”.
- Klik tab “Archive” (Arsip) untuk mengekspor file .rex yang sesuai dengan data mentah. Temukan eksperimen Anda menggunakan opsi filter (Gambar 21, kotak 27 dan 28) dan klik “Show assays” (Tampilkan uji kadar) (Gambar 21, kotak 29).



**Gambar 21. Lingkungan Archive (Arsip).** 27: Opsi filter. 28: Pemilihan uji kadar. 29: Tombol Show assays (Tampilkan uji kadar).

- Hasil eksperimen ditampilkan. Di pojok kanan bawah layar, pilih ".rex file" (file .rex) sebagai jenis file yang akan diekspor. Klik "Export" (Ekspor). Klik "OK" untuk menyimpan. Perangkat lunak secara otomatis menyimpan file .rex di folder yang telah ditentukan berikut: C: > Users > Public > Documents > QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments.

**Catatan:** Jalur dan folder ini dapat diubah di tab "Specify the .rex file export destination" (Tentukan tujuan ekspor file .rex).

**Catatan:** Untuk pemecahan masalah, diperlukan paket dukungan dari proses yang diperlukan. Paket dukungan dapat dibuat dari lingkungan persetujuan atau arsip (*Panduan Pengguna Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*, bagian "Pemecahan Masalah", "Membuat paket dukungan"). Selain itu, jejak audit dari waktu kejadian  $\pm 1$  hari mungkin dapat membantu. Jejak audit dapat diambil di lingkungan Layanan (*Panduan Pengguna Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*, Bagian 1.5.5.5).

4. Bongkar instrumen Rotor-Gene Q MDx dan buang tabung strip sesuai dengan peraturan keselamatan setempat.

# Interpretasi Hasil

Analisis dilakukan sepenuhnya otomatis.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 pertama\* menganalisis kurva amplifikasi dan dapat membatalkan kurva yang tidak sesuai, tergantung pada bentuk dan amplitudo deranya. Jika demikian halnya, sebuah tanda akan dikaitkan dengan kurva yang tidak valid.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 kemudian akan menganalisis kontrol proses:

- NTC: NTC diperiksa untuk mengetahui tidak adanya amplifikasi spesifik (JAK2 WT dan JAK2 MT).
- WT dan MT QS: Validasi dari kuantisasi standar didasarkan pada nilai  $R^2$  dan kemiringan setiap kurva standar.
- WTC: Jumlah salinan total JAK2 (TCN) harus cukup tinggi agar kontrol ini dapat ditafsirkan. Jika demikian halnya, persentase mutasi JAK2 akan dihitung. Kontrol proses ini divalidasi jika statusnya adalah WT menurut pengujian.
- MTC: Jumlah salinan total JAK2 harus cukup tinggi agar kontrol ini dapat ditafsirkan. Jika demikian halnya, persentase mutasi JAK2 akan dihitung. Kontrol proses ini divalidasi jika statusnya sangat positif untuk mutasi JAK2.

Kontrol internal (internal control, IC) harus diperkuat di semua sumuran yang berisi kontrol dan standar kuantisasi, dan harus berada dalam rentang yang telah ditentukan sebelumnya untuk kontrol.

**Catatan:** Laporan yang dibuat pada akhir setiap proses menunjukkan hasil yang diperoleh pada kontrol proses. Semua data yang tidak valid akan dikaitkan dengan tanda yang tidak valid (Tabel 6).

\* Diaktifkan hanya untuk target FAM.

Jika salah satu kontrol proses ini tidak sesuai, tanda “ASSAY\_INVALID” akan digunakan. Jika tanda ini disorot, maka proses akan dianggap tidak valid dan eksperimen perlu diulang.

Jika semua kontrol yang diproses sesuai, maka Rotor-Gene AssayManager v2.1 akan menganalisis sampel uji.

- Kontrol internal (internal control, IC) harus diperkuat di semua sumuran yang berisi sampel dan harus berada dalam kisaran yang telah ditentukan sebelumnya.
- Jumlah salinan total harus cukup tinggi dalam sampel tertentu agar hasilnya dapat ditafsirkan.
- Persentase mutasi JAK2 kemudian akan dihitung dan hasilnya akan ditampilkan. Nilai CT harus diamati di setiap tabung (WT dan MT) agar sampel divalidasi oleh Rotor-Gene AssayManager v2.1 dan agar hasil yang sesuai valid.

**Catatan:** Jika kontrol proses dan hasil sampel valid, laporan akan menampilkan nomor salinan dan persentase mutasi untuk setiap sampel.

- Tabel 6 menunjukkan tanda-tanda sampel yang tidak valid yang dapat ditetapkan ke tabung individual selama analisis oleh Rotor-Gene AssayManager v2.1, disertai penjelasan mengenai arti setiap tanda.
- Tabel 7 (halaman 67) menyediakan contoh tanda peringatan dan deskripsi istilah.

Tabel 6. Membatalkan contoh tanda dan deskripsi istilah

Tanda	Deskripsi
ANALYSIS_FAILED	Uji kadar ditetapkan menjadi tidak valid karena analisis gagal. Contact QIAGEN Technical Services. (Hubungi Layanan Teknis QIAGEN.)
ASSAY_INVALID	Uji kadar tidak valid karena setidaknya satu kontrol eksternal tidak valid.
CONSECUTIVE_FAULT	Target yang digunakan untuk penghitungan target ini tidak valid.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Kurva amplifikasi data mentah menunjukkan bentuk yang menyimpang dari perilaku yang ditetapkan untuk uji kadar ini. Terdapat kecenderungan tinggi hasil salah atau kesalahan interpretasi hasil.
FLAT_BUMP	Kurva amplifikasi data mentah menunjukkan bentuk seperti tonjolan datar yang menyimpang dari perilaku yang ditetapkan untuk uji kadar ini. Ada kemungkinan besar hasil yang salah atau salah tafsir hasil (misalnya, penentuan nilai $C_T$ yang salah).
INVALID_CALCULATION	Penghitungan untuk target ini gagal.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	Nilai $C_T$ yang terdeteksi lebih tinggi dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol mutan dengan campuran reaksi tipe liar.
MC_IC_LOW_CT (WT)	Nilai $C_T$ yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol mutan dengan campuran reaksi tipe liar.
MC_IC_NO_CT (MT)	Tidak ada $C_T$ yang terdeteksi untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol mutan dengan campuran reaksi mutan.
MC_IC_NO_CT (WT)	Tidak ada $C_T$ yang terdeteksi untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol mutan dengan campuran reaksi tipe liar.
MC_LOW_CN	Jumlah salinan untuk kontrol mutan terlalu rendah.
MC_LOW_PERCENTAGE	Persentase mutasi kontrol mutan terlalu rendah.
MC_NO_CN	Tidak ada nomor salinan untuk kontrol mutan.
MC_NO_CT (MT)	Tidak ada $C_T$ yang terdeteksi untuk kontrol mutan dengan campuran reaksi mutan.

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya

Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya  
**Tabel 6. Membatalkan contoh tanda dan deskripsi istilah (lanjutan)**

Tanda	Deskripsi
MC_NO_VALUE	Persentase mutasi kontrol mutan tidak memiliki nilai.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk kontrol mutan dengan campuran reaksi mutan.
MC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk kontrol mutan dengan campuran reaksi tipe liar.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Kurva amplifikasi memotong ambang batas lebih dari sekali. C <sub>T</sub> yang tidak ambigu tidak dapat ditentukan.
NO_BASELINE	Tidak ditemukan adanya garis dasar awal. Analisis berikutnya tidak dapat dilakukan.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	Nilai C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih tinggi dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol tanpa templat dengan campuran reaksi mutan.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	Nilai C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih tinggi dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol tanpa templat dengan campuran reaksi tipe liar.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Tidak ada C <sub>T</sub> yang terdeteksi untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol tanpa templat dengan campuran reaksi mutan.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Tidak ada C <sub>T</sub> yang terdeteksi untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol tanpa templat dengan campuran reaksi tipe liar.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	Nilai C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol tanpa templat dengan campuran reaksi mutan.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	Nilai C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih rendah daripada yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol tanpa templat dengan campuran reaksi tipe liar.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	C <sub>T</sub> telah terdeteksi pada kontrol tanpa templat.
OTHER_TARGET_INVALID	Target lain untuk sampel yang sama tidak valid.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	Penghitungan konsentrasi untuk sampel ini melebihi batas teknis.

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya

Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya  
**Tabel 6. Membatalkan contoh tanda dan deskripsi istilah (lanjutan)**

Tanda	Deskripsi
QS_HIGH_SLOPE (MT)	Batas atas kemiringan mutan terlampaui.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	Batas atas kemiringan tipe liar telah terlampaui.
QS_IC_NO_CT (MT)	Tidak ada C <sub>T</sub> yang terdeteksi untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan satu atau lebih standar kuantifikasi mutan.
QS_IC_NO_CT (WT)	Tidak ada C <sub>T</sub> yang terdeteksi untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan satu atau lebih standar kuantifikasi tipe liar.
QS_LOW_SLOPE (MT)	Batas bawah kemiringan mutan tidak terpenuhi.
QS_LOW_SLOPE (WT)	Batas bawah kemiringan tipe liar tidak terpenuhi.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	Batas bawah mutan R <sup>2</sup> tidak terpenuhi.
QS_LOW_RSQUARED (WT)	Batas bawah R <sup>2</sup> tipe liar tidak terpenuhi.
QS_NO_CT (MT)	Tidak ada C <sub>T</sub> yang terdeteksi untuk satu atau lebih standar kuantifikasi mutan.
QS_NO_CT (WT)	Tidak ada C <sub>T</sub> yang terdeteksi untuk satu atau lebih standar kuantifikasi tipe liar.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk satu atau lebih standar kuantifikasi mutan.
QS_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk satu atau lebih standar kuantifikasi tipe liar.
RUN_FAILED	Uji kadar ditetapkan tidak valid karena masalah dengan cycler atau koneksi cycler.
RUN_STOPPED	Uji kadar ditetapkan tidak valid karena proses dihentikan secara manual.
SAMPLE_LOW_CN	Jumlah salinan total untuk sampel uji terlalu rendah.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	Nilai C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih tinggi dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama sebagai sampel uji dengan campuran reaksi mutan.

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya



Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya  
**Tabel 6. Membatalkan contoh tanda dan deskripsi istilah (lanjutan)**

Tanda	Deskripsi
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	Nilai C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama sebagai sampel uji dengan campuran reaksi mutan.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Tidak ada C <sub>T</sub> yang terdeteksi untuk kontrol internal dalam tabung yang sama sebagai sampel uji dengan campuran reaksi mutan.
SAMPLE_NO_CN	Tidak ada nomor salinan untuk sampel uji.
SAMPLE_NO_VALUE	Persentase mutasi sampel uji tidak memiliki nilai.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk sampel uji dengan campuran reaksi mutan.
SAMPLE_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk sampel uji dengan campuran reaksi tipe liar.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	Nilai C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih tinggi dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama sebagai sampel uji dengan campuran reaksi tipe liar.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	Nilai C <sub>T</sub> yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama sebagai sampel uji dengan campuran reaksi tipe liar.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Tidak ada C <sub>T</sub> yang terdeteksi untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan sampel uji dengan campuran reaksi tipe liar.
SATURATION	Fluoresens data mentah mengalami saturasi dengan kuat sebelum titik infleksi kurva amplifikasi.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Lonjakan terdeteksi pada kurva amplifikasi dekat C <sub>T</sub> .
STEEP_BASELINE	Garis dasar yang meningkat tajam untuk fluoeresens data mentah terdeteksi dalam kurva amplifikasi.
STRONG_BASELINE_DIP	Penurunan tajam dalam garis dasar untuk fluoeresens data mentah terdeteksi dalam kurva amplifikasi.
STRONG_NOISE	Derau kencang terdeteksi di luar fase pertumbuhan kurva amplifikasi.

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya

Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya

**Tabel 6. Membatalkan contoh tanda dan deskripsi istilah (lanjutan)**

Tanda	Deskripsi
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Terdeteksi derau kencang dalam fase pertumbuhan (eksponensial) kurva amplifikasi.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Garis dasar bergelombang untuk fluorens data mentah terdeteksi dalam kurva amplifikasi.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	Persentase mutasi kontrol tipe liar terlalu tinggi.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	Nilai $C_T$ yang terdeteksi lebih tinggi dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol tipe liar dengan campuran reaksi mutan.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	Nilai $C_T$ yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol tipe liar dengan campuran reaksi mutan.
WTC_IC_NO_CT (MT)	Tidak ada $C_T$ yang terdeteksi untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol tipe liar dengan campuran reaksi mutan.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Tidak ada $C_T$ yang terdeteksi untuk kontrol internal dalam tabung yang sama dengan kontrol tipe liar dengan campuran reaksi tipe liar.
WTC_NO_CN	Tidak ada nomor salinan untuk kontrol tipe liar.
WTC_NO_VALUE	Persentase mutasi kontrol tipe liar tidak memiliki nilai.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (MT)	$C_T$ yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk kontrol tipe liar dengan campuran reaksi mutan.
WTC_UNEXPECTED_EARLY_CT (WT)	$C_T$ yang terdeteksi lebih rendah dari yang diharapkan untuk kontrol tipe liar dengan campuran reaksi tipe liar.

Tabel 7. Contoh tanda peringatan dan deskripsi istilah

Tanda	Deskripsi
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Persentase perubahan fluoresens untuk sampel ini yang relatif terhadap tabung dengan perubahan fluoresens terbesar lebih rendah dari batas yang ditentukan.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Efisiensi reaksi untuk sampel ini belum mencapai batas yang ditentukan.
SPIKE	Lonjakan fluoresens data mentah terdeteksi dalam kurva amplifikasi tetapi di luar wilayah tempat C <sub>t</sub> ditentukan.

## Batasan

Kit ini ditujukan untuk penggunaan profesional.

Produk ini hanya boleh digunakan oleh para profesional yang diberi instruksi khusus, terlatih dalam teknik biologi molekuler, dan memahami teknologi perangkat. Prosedur perangkat akan diimplementasikan di lingkungan laboratorium biologi molekuler.

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit bukanlah perangkat otomatis; namun, analisisnya dibantu oleh perangkat lunak khusus untuk kuantifikasi mutasi otomatis.

Kit ini harus digunakan sesuai dengan petunjuk yang diberikan dalam panduan ini, dikombinasikan dengan instrumen tervalidasi yang disebutkan dalam "Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Disediakan", halaman 19.

Perhatian harus diberikan pada tanggal kedaluwarsa yang tercetak pada label kotak dan label tabung. Jangan gunakan komponen yang sudah habis masa berlakunya.

Semua reagen yang disediakan dalam *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dimaksudkan untuk digunakan hanya dengan reagen lain yang disediakan dalam kit yang sama. Gagal mengikuti pedoman ini dapat memengaruhi kinerja.

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit hanya divalidasi untuk darah utuh perifer manusia yang diantikoagulasi dengan 2K-EDTA yang dikumpulkan dari pasien dengan dugaan atau diagnosis MPN.

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit divalidasi hanya untuk digunakan dengan QIAasymphony DNA DSP Mini Kit (nomor kat. 937236) atau QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (nomor kat. 61104).

*ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit divalidasi hanya untuk digunakan dengan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (untuk PCR) dan QIAsymphony SP (untuk persiapan sampel).

Setiap penggunaan produk ini dan/atau modifikasi komponen di luar spesifikasi pada label akan meniadakan tanggung jawab QIAGEN.

Setiap hasil diagnostik yang dihasilkan harus ditafsirkan bersamaan dengan temuan klinis-patologis lainnya. Tidak adanya mutasi JAK2 V617F/G1849T tidak menyingkirkan keberadaan mutasi JAK2 lainnya. Pengujian ini dapat melaporkan hasil negatif palsu jika terdapat mutasi tambahan yang terletak pada nukleotida 88504 hingga 88622 (16).

Pengguna bertanggung jawab untuk memvalidasi kinerja sistem untuk setiap prosedur yang digunakan di laboratorium mereka yang tidak dicakup oleh studi kinerja QIAGEN.

# Karakteristik Kinerja

## Kinerja Analitikal

### Batas kosong

Batas kosong (LOB) ditentukan mengikuti standar CLSI/NCCLS EP17-A2, pada 30 sampel darah utuh donor sehat dengan status JAK2 tipe liar (wild-type, WT), menggunakan tiga lot reagen (120 pengukuran/lot).

Hasil LOB dirangkum dalam Tabel 8. Hal ini sesuai dengan nilai yang diharapkan pada populasi normal menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

Tabel 8. Ringkasan hasil LOB

	LOB yang diukur	Batas kosong akhir
Lot 1	0%	0%
Lot 2	0%	
Lot 3	0%	

### Batas deteksi

Batas deteksi (LOD atau sensitivitas analitis) ditentukan berdasarkan “Pendekatan probit” yang dijelaskan dalam standar CLSI/NCCLS EP17-A2. Dalam studi ini, 6 mutasi tingkat rendah dianalisis untuk 3 sampel independen (DNA darah utuh MPN yang dicampurkan ke dalam DNA darah utuh tipe liar (WT)), dengan 3 lot, 60 pengukuran per sampel dan per mutasi. Hasil yang diperoleh menunjukkan sensitivitas analisis sebesar 0,042% terhadap mutasi JAK2 V617F.

Hasil LOD dirangkum dalam Tabel 9.

Tabel 9. Ringkasan hasil LOD

	LOD yang diukur	Batas deteksi akhir
Lot 1	0,041%	
Lot 2	0,029%	0,042%
Lot 3	0,042%	

Batas kuantifikasi

Definisi dan penentuan batas kuantisasi (LOQ) didasarkan pada pedoman CLSI/NCCLS EP17-A2. LoQ didefinisikan sebagai tingkat persentase mutasi JAK2 V617F terendah yang dapat dibedakan secara akurat dari LoD *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dengan interval kepercayaan 95% (risiko kesalahan  $\alpha = 0,05$ ). Data dari studi keterulangan satu lokasi digunakan untuk menghitung LoQ *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Hasil yang diperoleh menunjukkan LoQ sebesar 0,233% dari mutasi JAK2 V617F.

Dalam konteks pemantauan penyakit molekuler, ini menunjukkan bahwa jika persentase mutasi JAK2 V617F yang terukur di bawah 0,233% pada titik waktu tertentu, pengurangan beban alel JAK2 V617F tidak dapat diukur secara andal pada titik waktu berikutnya.

Linearitas

Linearitas kuantifikasi mutasi JAK2 pada pasien MPN dinilai menurut standar CLSI/NCCLS EP06AE, dengan satu lot *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dan dengan pengujian pada 11 tingkat mutasi untuk lima input DNA yang berbeda. Kuantifikasi beban mutasi JAK2 dalam sampel MPN bersifat linear; yaitu, *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit mampu mengkuantifikasi sampel dari nilai LOD hingga 100% mutasi, yang sesuai dengan nilai yang diharapkan dalam populasi yang terpengaruh, selama konsentrasi sampel DNA yang dikuantifikasi mendekati 10 ng/ $\mu$ l (antara 5 dan 20 ng/ $\mu$ l).

## Keterulangan dan reproduksibilitas

Desain studi presisi satu lokasi memenuhi persyaratan standar CLSI/NCCLS EP5-A3. Pengujian dilakukan pada 11 tingkat mutasi, dari 0,07% hingga 72,67%, menggunakan pengenceran serial sampel klinis dari pasien MPN. Untuk setiap tingkat mutasi, 108 pengukuran diperoleh oleh tiga operator selama 27 hari (dua replikat per pengujian dan dua pengujian per hari) menggunakan tiga lot *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dan tiga instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Presisi untuk level 100% dinyatakan melalui perbandingan dengan presisi yang ditentukan untuk level 72,67%, berdasarkan analisis tren yang didukung oleh data tambahan yang diperoleh pada sampel JAK2 V617F 100% yang terdiri dari DNA dari garis sel MUTZ-8 (38 pengukuran).

Hasilnya dirangkum dalam Tabel 10.



Tabel 10. Hasil presisi: keterulangan (studi satu lokasi)

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

SD: Simpangan baku

R+: Keterulangan

RUN++: Presisi antar proses

TOTAL+++: Presisi total (termasuk antar instrumen, antar operator, dan antar lot)

CV<sub>TOTAL</sub>: Koefisien variasi untuk presisi total dalam persentase

ND: Belum ditentukan

Desain studi presisi antar laboratorium memenuhi persyaratan standar CLSI/NCCLS EP5-A3. Studi ini melibatkan empat lokasi (Prancis, Jerman, dan dua lokasi di AS). Pengujian dilakukan pada tujuh tingkat mutasi, dari 1,21% hingga 67,64%, menggunakan pengenceran garis sel MUTZ-8 dalam darah utuh donor sehat (yaitu sampel yang dibuat-buat). Setiap lokasi melakukan tiga proses ekstraksi DNA menggunakan instrumen QIAsymphony SP dan satu batch unik QIAsymphony DSP DNA Mini Kit. Setiap ekstrak DNA diuji dalam delapan proses qPCR (dua proses per hari dan per lokasi selama empat hari tidak berurutan) menggunakan batch unik *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, menghasilkan 96 pengukuran yang diharapkan per sampel di semua lokasi.

Sampel L2 tidak valid dalam satu proses ekstraksi yang menyebabkan jumlah total pengujian qPCR menjadi 88, bukan 96. Selain itu, satu proses qPCR tidak valid, yang menyebabkan tiga pengujian tidak valid untuk semua sampel (kecuali L2, yaitu 2 hasil tidak valid). Selain itu, sampel L7 tidak valid dalam satu kali proses qPCR dan L4 tidak valid dalam dua kali proses qPCR yang menyebabkan dua pengujian tambahan yang tidak valid (Tabel 11).

Presisi untuk level 100% dinyatakan melalui perbandingan dengan presisi yang ditentukan untuk level 67,64%, berdasarkan analisis tren yang didukung oleh data tambahan yang diperoleh pada sampel JAK2 V617F 100% yang terdiri dari DNA dari garis sel MUTZ-8 (38 pengukuran).

Tabel 11. Hasil presisi: reproduksibilitas (studi antar laboratorium)

Sampel	Total uji	Total uji tidak valid	Rata-rata JAK2%MT	Dalam proses, SD, %CV	Antar proses dalam sehari, SD, %CV	Antar hari, SD, %CV	Antar lokasi, SD, %CV	Total, SD, %CV
L0	T/A	T/A	100	T/A	T/A	T/A	T/A	≤4,074, ≤6,02
L1	96	3	67,64	2,616, 3,87	2,060, 3,05	1,999, 2,96	1,530, 2,26	4,074, 6,02
L2	88	2	40,03	3,482, 8,70	1,011, 2,53	2,389, 5,97	0,986, 2,46	4,387, 10,96
L3	96	3	22,26	3,318, 14,90	1,256, 5,64	1,257, 5,64	0,803, 3,61	3,807, 17,10
L4	96	5	8,02	1,770, 22,06	0516, 6,44	0,000, 0,00	0,000, 0,00	1,841, 22,95
L5	96	3	4,35	0,706, 6,23	0,547, 12,57	0,000, 0,00	0,197, 4,53	0,906, 20,82
L6	96	3	2,03	0,246, 12,15	0,365, 18,00	0,063, 3,11	0,000, 0,00	0,441, 21,76
L7	96	4	1,21	0,104, 8,62	0,057, 4,72	0,211, 17,43	0,000, 0,00	0,189, 15,64

JAK2%MT: persentase mutasi JAK2; SD: Simpangan baku; CV: Koefisien variasi dalam persentase; T/A: Tidak berlaku

Studi antar laboratorium tambahan dilakukan di tiga lokasi pengujian (satu di Eropa dan dua di AS), pada empat sampel darah utuh dari pasien MPN (yaitu sampel klinis). Setiap lokasi melakukan tiga proses ekstraksi DNA. Setiap ekstrak DNA diuji dalam 12 proses qPCR (satu replikat per proses per sampel, dua proses per hari per operator di setiap lokasi - dua operator per lokasi dilibatkan - selama tiga hari yang tidak berurutan) pada satu instrumen Rotor-Gene Q MDx menggunakan satu lot *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Untuk setiap sampel, diperoleh 36 pengukuran (Tabel 12).

Tabel 12. Hasil studi antar laboratorium tambahan

Sampel	N	Rata-rata JAK2%MT	Dalam proses, SD, %CV	Antar proses dalam sehari, SD, %CV	Antar hari, SD, %CV	Antar lokasi, SD, %CV	Total, SD, %CV
Sampel 1	36	95,19	0,995, 1,04	0,000, 0,00	0,541, 0,57	0,000, 0,00	1,130, 1,19,
Sampel 2	36	22,83	3,988, 17,47	0,000, 0,00	1,707, 7,48	1,552, 6,80	4,501, 19,72
Sampel 3	36	14,44	2,257, 15,63	1,398, 9,68	0,000, 0,00	1,422, 9,84	2,890, 20,01
Sampel 4	36	4,03	0,186, 4,63	0,835, 20,74	0,000, 0,00	0,608, 15,09	0,922, 22,91

JAK2%MT: persentase mutasi JAK2; N: Jumlah pengukuran; SD: Simpangan baku; CV: Koefisien variasi dalam persentase

Zat yang Mengganggu (Spesifitas Analitikal)

Desain penelitian ini memenuhi persyaratan standar NCCLS EP7-A3 “Pengujian Interferensi dalam Kimia Klinis”. Sebanyak 19 zat yang berpotensi terkandung dalam sampel darah dipilih karena efek potensialnya pada PCR (busulfan, citalopram hidrobromida, paroxetine hidroklorida hemihidrat, sertralin hidroklorida, fluoxetine hidroklorida, acetaminophen [parasetamol], bilirubin tak terkonjugasi, kalium 2K EDTA dan 3K EDTA, natrium EDTA, Hgb [manusia], trigliserida, lisinopril dehidrat, hidroksiurea, asam asetilsalisilat, asam salisilat, tiotepa, anagrelida, interferon alfa 2b).

Zat dari proses ekstraksi DNA juga dinilai (QSL1, QSB1, QSW1, QSW2 dan PK dari QIAsymphony DSP DNA Blood Mini Kit; QIAGEN Protease, etanol, AW1 dan AW2 dari QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit).

Hasil yang diperoleh menunjukkan tidak adanya efek yang mengganggu dari zat-zat tersebut.

Tabel 13. Zat yang mengganggu

Zat yang diuji	Konsentrasi yang diuji
Bilirubin tak terkonjugasi	150,3 µg/mL
Hemoglobin [manusia]	2000 µg/mL
Trigliserida	30000 µg/mL
Busulfan	38,4 µg/mL
Citalopram hidrobromida	0,75 µg/ml
Paroksetin hidroklorida hemihidrat	1,14 µg/mL
Sertralin hidroklorida	0,67 µg/mL
Fluoksetin hidroklorida	3,87 µg/mL
Asetaminofen [parasetamol]	200,7 µg/mL
Lisinopril dehidrasi	0,33 µg/mL
Hidroksiurea	28,2 µg/mL
Asam asetilsalisilat	651,6 µg/mL
Asam salisilat	0,6 µg/mL
Thio-tepa	48 µg/mL
Anagrelida	6 µg/mL
Interferon alfa 2b*	1,8 MU/L
Kalium EDTA (2K-EDTA)	2X (3600 µg/mL)
Kalium EDTA (3K-EDTA) †	1X (1800 µg/mL), 3X (5400 µg/mL)

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya

Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya

Tabel 13. Zat yang mengganggu (lanjutan)

Zat yang diuji	Konsentrasi yang diuji
Natrium EDTA (2Na-EDTA) †	1X (3000 µg/ml), 3X (9000 µg/ml)
QSL1	2% dari total volume sampel
QSB1	2% dari total volume sampel
QSW1	2% dari total volume sampel
QSW2	2% dari total volume sampel
proteinase K (PK) ‡	2% dari total volume sampel
proteinase K (PK) ‡	2x volume tersisa yang diharapkan setelah proses ekstraksi 3x volume tersisa yang diharapkan setelah proses ekstraksi
QIAGEN Protease (Protease QIAGEN)	1,29E-05 % dari total volume sampel
Etanol (EtOH)	1,29E-03 % dari total volume sampel
Buffer AW1	1,00 E-01 % dari total volume sampel
Buffer AW2	1,00% dari total volume sampel

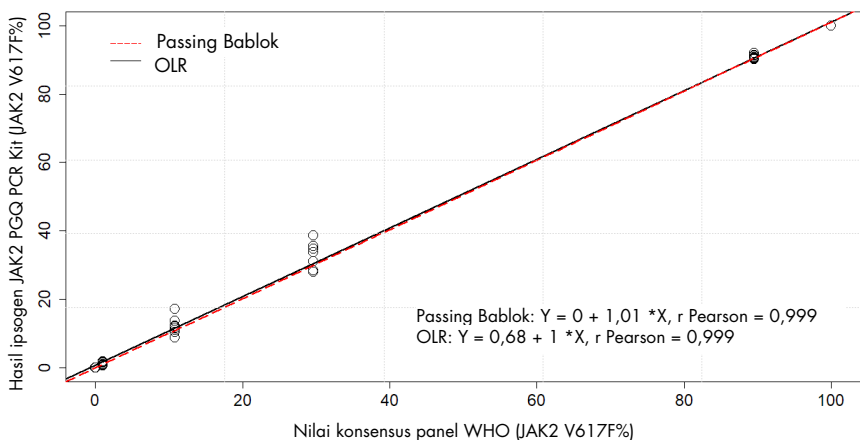
\* Dosis yang direkomendasikan untuk pasien PV adalah 3 MU, yang diasumsikan terdistribusi dalam 5 liter darah (individu dengan berat badan 80 kg), menghasilkan konsentrasi 0,6 MU/L. Mengikuti rekomendasi standar NCCLS EP7-A2, konsentrasi ini diuji tiga kali, yaitu 1,8 MU/L.

† 1x konsentrasi sesuai dengan penyedia

‡ Penyebab PK efek yang mengganggu saat diuji pada 2% dari total volume sampel (tidak mungkin terjadi); pengujian lebih lanjut mengonfirmasi PK dihilangkan selama proses ekstraksi: tidak ada gangguan yang diharapkan dalam kondisi penggunaan normal.

## Pengujian Panel Referensi Internasional WHO untuk JAK2 V617F Genomik (NIBSC, kode panel 16/120)

Panel Referensi Internasional pertama WHO untuk JAK2 V617F Genomik yang dikembangkan oleh Institut Nasional untuk Standar dan Kontrol Biologi (NIBSC, kode panel 16/120) diuji menggunakan tiga lot *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (tiga replikat per tingkat panel referensi dan per lot reagen). Eksperimen dilakukan selama tiga hari oleh satu operator, menggunakan satu instrumen Rotor-Gene Q 5plex HRM. Konkordansi antara hasil *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dan nilai konsensus yang dipublikasikan dalam Petunjuk Penggunaan Panel Referensi dinilai menggunakan regresi linier biasa (kemiringan: 1,003, 95%CI [0,997 ; 1,010] – intersep: 0,677, 95%CI [0,212 ; 1,289]) dan regresi Passing-Bablok (kemiringan: 1,01, 95%CI [1,00 ; 1,021] – intersep: 0,00, 95%CI [-0,02 ; 0,010]) (Gambar 22). Konkordansi dikonfirmasi, menunjukkan kesesuaian kit dalam menyediakan data JAK2 V617F yang sesuai dengan teknik diagnostik lain yang umum digunakan.



**Gambar 22. Konkordansi antara hasil ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit dan nilai konsensus Panel Referensi Internasional WHO untuk JAK2 V617F Genomik (NIBSC, kode panel 16/120).** Konkordansi dinilai menggunakan Regresi Linier biasa (OLR) dan Regresi Passing Bablock. Panel terdiri dari tujuh level JAK2 V617F: 100%, 89,5%, 29,6%, 10,8%, 1,00%, 0,03%, dan 0%. Nilai konsensus WHO ditentukan menggunakan berbagai teknik yang umum digunakan sebagai bagian dari studi kolaboratif internasional; nilai referensi yang dikaitkan dengan setiap tingkat JAK2 V617F% adalah nilai median (informasi selengkapnya di <https://www.nibsc.org>).



## Kebenaran dan akurasi

Ketepatan pengukuran berbanding terbalik dengan kesalahan pengukuran sistematis (SE atau bias). Bias dihitung berdasarkan petunjuk dari pedoman NCCLS EP09c, untuk setiap kadar JAK2 V617F% pada panel referensi, untuk setiap lot reagen serta untuk semua lot reagen (Tabel 14), menggunakan data dari studi yang dijelaskan di atas. Nilai bias tertinggi diperoleh dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit lot 2.

Akurasi adalah kedekatan kesepakatan antara hasil pengujian dan nilai referensi yang diterima (dalam hal ini, nilai yang ditetapkan untuk setiap tingkat JAK2 V617F% dari panel WHO). Akurasi memperhitungkan kebenaran dan presisi, dan berbanding terbalik dengan total kesalahan, dihitung seperti yang ditunjukkan pada Tabel 14.

Tabel 14. Bias dan kesalahan pengukuran

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

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya

Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya

Tabel 14. Bias dan kesalahan pengukuran (lanjutan)

Nilai referensi Kode ampul Panel WHO	Lot ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit	Bias (SE) per lot [95% CI]	Bias (SE) keseluruhan [95% CI]	Kesalahan total (Akurasi)
15/244 29,6%	1	0,970 [-8,238 ; 10,178]	2,874 [0,016 ; 5,733]	5,589
	2	6,347 [0,141 ; 12,552]		
	3	1,307 [-5,767 ; 8,381]		
15/246 89,5%	1	1,000 [-0,295 ; 2,295]	1,381 [0,889 ; 1,873]	≤ 5,622
	2	1,783 [-0,316 ; 3,883]		
	3	1,360 [0,270 ; 2,450]		
15/164 100%	1	-0,017 [-0,031 ; -0,002]	-0,017 [-0,021 ; -0,013]	≤ 5,450
	2	-0,020 [T/A]		
	3	-0,013 [-0,028 ; 0,001]		

SE: Kesalahan sistematis atau bias, yaitu perbedaan antara rata-rata pengukuran individu yang diperoleh dengan ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit ( $\bar{V}_{\text{JAK2 Kit}}$ ) dan nilai konsensus panel referensi WHO ( $V_{\text{Ref}}$ ).

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

Kesalahan total (TE) dihitung sebagai  $TE = \sqrt{S^2 + SE^2}$ , di mana s adalah deviasi standar (kesalahan acak).

95% CI: Interval kepercayaan 95%

N/A: tidak berlaku

Akurasi analitis

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memvalidasi akurasi analitis *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dalam kondisi penggunaan normal dengan sampel klinis dari subjek yang diduga menderita neoplasma mieloproliferatif. Studi ini dilakukan pada sampel gDNA yang diekstraksi dari total 473 spesimen: 276 dengan dugaan PV, 98 dengan ET dan 99 dengan PMF. Status JAK2 V617F dari sampel pasien yang diperoleh dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dibandingkan dengan status JAK2 V617F yang diperoleh dengan metode referensi untuk penentuan status JAK2, yaitu, sekuensing dua arah (BDS) yang divalidasi secara independen. Karena LoD *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit adalah 0,042% dari JAK2 V617F, status JAK2 V617F dari sampel pasien yang diuji dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit adalah positif di atas atau pada batas ini dan negatif di bawah batas ini. Dari 473 spesimen, 22 spesimen positif JAK2 dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit sementara negatif dengan BDS.

Kesepakatan keseluruhan adalah 95,35% (451/473 subjek; 95% CI: 93,04%, 97,06%). Kesepakatan positif adalah 100% (165/165 subjek; 95% CI: 97,79%, 100%) dan kesepakatan negatif sebesar 92,86% (286/308 subjek; 95% CI: 89,39%; 95,47%). Hasilnya ditunjukkan pada Tabel 15.

Tabel 15. Konkordansi antara *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dan sekuensing dua arah Sanger pada populasi MPN (gabungan populasi ET, PMF, dan PV)

		Sekuenings dua arah Sanger		
		JAK2 V617F positif	JAK2 V617F negatif	Total
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	JAK2 V617F positif	165	22	187
	JAK2 V617F negatif	0	286	286
	Total	165	308	473

## Penilaian hasil studi akurasi analitis pada kohort MPN

Konkordansi antara hasil yang diperoleh untuk mutasi JAK2 V617F dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dan dengan sekuensing Sanger (BDS) pada subjek dengan ET, PMF, dan PV disediakan secara terpisah:

- Untuk ET, kesepakatan keseluruhan adalah 89,8% (88/98 subjek; 95% CI: 82,03–95,0%), kesepakatan positif adalah 100% (43/43 subjek; 95% CI: 91,78–100%) dan kesepakatan negatif adalah 81,82% (45/55 subjek; 95% CI: 69,1–90,92%).
- Untuk PMF, kesepakatan keseluruhan adalah 93,94% (93/99 subjek; 95% CI: 87,27–97,74%), kesepakatan positif adalah 100% (51/51 subjek; 95% CI: 93,02–100%) dan kesepakatan negatif adalah 87,5% (42/48 subjek; 95% CI: 74,75–95,27%).
- Untuk PV, kesepakatan keseluruhan adalah 97,83% (270/276 subjek; 95% CI: 95,33–99,2%), kesepakatan positif adalah 100% (71/71 subjek; 95% CI: 94,94–100%) dan kesepakatan negatif adalah 97,07% (199/205 subjek; 95% CI: 93,74–98,92%).

Spesimen yang menghasilkan hasil yang tidak sesuai tampaknya memiliki tingkat mutasi di bawah kemampuan deteksi BDS (sekitar 10%). Karena sekuensing Sanger tidak sesensitif *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit yang dapat melaporkan nilai serendah 0,042% dari JAK2 V617F (yaitu nilai LoD), studi terpisah dilakukan dengan menggunakan metode pengurutan generasi berikutnya (NGS) yang tervalidasi untuk mendeteksi alel JAK2 V617F dalam 15/22 sampel yang tidak sesuai (sembilan ET, lima PMF, dan satu PV), serta serangkaian berisi 22 spesimen yang dipilih secara acak yang sesuai dengan JAK2 V617F positif dan negatif. Status JAK2 V617F sampel pasien ditentukan dengan metode NGS berdasarkan batas sensitivitas analisisnya (yaitu antara 1% dan 2% dari JAK2 V617F). Oleh karena itu, status JAK2 V617F pada sampel pasien adalah positif jika mutasi JAK2 V617F terdeteksi dengan metode NGS dan, sebaliknya status JAK2 V617F adalah negatif jika mutasi JAK2 V617F tidak terdeteksi.

Semua 15 spesimen yang tidak sesuai diuji positif oleh NGS, sesuai dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit. Semua sampel yang sesuai diuji sama dengan NGS dan sesuai dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dan BDS. Tujuh sampel lainnya dianggap tidak sesuai karena data NGS tidak tersedia untuk sampel tersebut.

## Kesimpulan dari studi akurasi analitis

Setelah pengklasifikasian ulang kasus-kasus yang tidak sesuai menggunakan hasil NGS, *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit menunjukkan akurasi sebesar 98,3% dalam mendeteksi alel JAK2 V617F pada spesimen dari subjek MPN dengan kadar JAK2 V617F  $\geq 0,042\%$  (yaitu nilai LoD).

## Kinerja Klinis

Kinerja klinis *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dalam diagnosis PV dievaluasi selama studi intervensional, prospektif, internasional, dan multipusat.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menunjukkan keakuratan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dalam mendeteksi mutasi V617F pada subjek yang diduga menderita PV. Referensi untuk penentuan status JAK2 adalah metode sekuensing dua arah (BDS) yang divalidasi secara independen.

Deteksi mutasi JAK2 V617F pertama kali diperkenalkan dalam kriteria referensi WHO 2008 untuk diagnosis MPN BCR-ABL negatif, dan keberadaan mutasi ini merupakan kriteria utama untuk konfirmasi diagnostik (17.)

Keberadaan JAK2 V617F merupakan salah satu dari dua kriteria diagnostik utama (PV dipastikan jika terdapat dua kriteria utama dan satu kriteria minor atau kriteria utama pertama dan dua kriteria minor yang ada menurut WHO 2008\* ; (untuk rinciannya lihat referensi 17)

Tujuannya adalah untuk mengevaluasi spesifisitas, sensitivitas, nilai prediksi positif (PPV), nilai prediksi negatif (NPV) dan rasio kemungkinan untuk diagnosis yang ditetapkan oleh kriteria diagnostik WHO 2008. \* menggunakan penentuan status JAK2 V617F menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dengan batas 0,042% untuk kepositifan (yaitu LoD kit) atau BDS.

\* Karena studi kinerja klinis dimulai sebelum pembaruan kriteria diagnostik WHO tahun 2016, kriteria diagnostik WHO tahun 2008 digunakan untuk melakukan studi kinerja klinis.

Penelitian ini dilakukan di sembilan lokasi penelitian di AS (tujuh subjek terdaftar), 12 lokasi penelitian di Prancis (keseluruhan 12 subjek terdaftar), dan sembilan lokasi penelitian di Italia (lima subjek terdaftar). Subjek disaring dan dipilih berdasarkan kriteria inklusi yang menyarankan diagnosis PV. Semua subjek yang terdaftar menerima pengujian darah dengan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dan pengujian referensi, penentuan sekuensing dua arah (BDS) dari JAK2 V617F dan status ekson 12 JAK2. Subjek dengan ciri-ciri klinis yang sesuai dengan diagnosis PV (termasuk peningkatan hemoglobin dan penurunan kadar eritropoietin [EPO]), tetapi dengan JAK2 V617F negatif dan penentuan ekson 12 oleh BDS, dan subjek dengan JAK2 V617F positif dan penentuan ekson 12 oleh BDS dan kadar EPO normal atau tinggi, harus menjalani biopsi sumsum tulang dengan analisis histologis dan sitogenetik, seperti yang dipersyaratkan oleh algoritma diagnostik WHO tahun 2008 untuk penyakit mieloproliferatif. Diagnosis akhir (PV atau non-PV) ditetapkan berdasarkan hasil prosedur studi non-investigasi (yaitu, kriteria WHO 2008 dengan penentuan mutasi JAK2 menggunakan uji kadar BDS referensi).

Sebanyak 216 subjek yang ditetapkan sebagai populasi yang dapat dievaluasi mencakup semua peserta yang berhasil memenuhi kriteria penyaringan klinis dan kriteria analitis menggunakan uji kadar BDS referensi. 67 subjek tambahan tidak dapat dievaluasi karena alasan yang dijelaskan di Tabel 16 (beberapa subjek tidak dapat dievaluasi karena beberapa alasan).

Tabel 16. Alasan pengecualian dalam populasi terdaftar

Alasan	Jumlah subjek
Kegagalan kriteria inklusi atau eksklusi	9
Hasil EPO hilang	22
Biopsi BM yang hilang, jika diperlukan untuk diagnosis PV	26
JAK2 V617F positif dengan BDS dan serum EPO dalam batas normal	15
JAK2 Ekson 12 positif dengan BDS dan serum EPO dalam batas normal	1
JAK2 V617F negatif oleh BDS dan serum EPO sangat rendah	10
Pasien tidak menyelesaikan studi dan/atau tidak memiliki diagnosis akhir PV.	15

Untuk studi ini, total 221 penilaian status JAK2 V617F (termasuk lima pengujian ulang) dilakukan menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit pada instrumen Rotor-Gene Q MDx (Tabel 17, Tabel 18).

Tabel 17. Ringkasan hasil pengujian *ipsogen* JAK2 RGQ PCR (populasi yang dapat dievaluasi)

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Total (N=216)
JAK2 V617F positif ( $\geq$ LoD yaitu 0,042%)	54
JAK2 V617F negatif ( $<$ LoD yaitu 0,042%)	162



Tabel 18. Ringkasan hasil pengujian *ipsogen* JAK2 RGQ PCR – populasi positif JAK2 V617F (di antara populasi yang dapat dievaluasi)

<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Total (N=54)
Nilai rata-rata JAK2 %MT yang diperoleh	51,54
Nilai minimum JAK2 %MT diperoleh	0,14
Nilai maksimum JAK2 %MT yang diperoleh	93,43

N: Jumlah sampel; JAK2 %MT: Persentase mutasi JAK2

### Penilaian hasil studi validasi: hasil kinerja

Perbandingan diagnosis akhir PV dan non-PV menunjukkan bahwa kedua metode diagnosis tersebut sesuai: 94,6% subjek (53/56 subjek) yang didiagnosis dengan PV oleh peneliti juga didiagnosis dengan PV menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dan kriteria diagnostik WHO. Demikian pula, 95,6% subjek (153/160 subjek) yang didiagnosis sebagai non-PV oleh peneliti juga didiagnosis sebagai non-PV menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dan kriteria diagnostik WHO (Tabel 19, Tabel 20).

Status mutasi JAK2 V617F dan ekson 12 oleh BDS, dan JAK2 V617F oleh *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dirangkum dalam Tabel 19. Perbandingan diagnosis PV dan non-PV yang ditetapkan menggunakan setiap metode pengujian disediakan dalam Tabel 19.

**Tabel 19. Status mutasi (JAK2 V617F melalui sekuensing dua arah, ekson 12 JAK2 melalui pengurutan dua arah, dan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit) berdasarkan status PV (populasi yang dapat dievaluasi)**

Variabel	PV (N=56)	Non-PV (N=160)	Total (N=216)
Status mutasi JAK2 V617F menurut BDS			
Positive (Positif)	48 (85,7%)	1 (0,6%)	49 (22,7%)
Negative (Negatif)	8 (14,3%)	159 (99,4%)	167 (77,3%)
Status mutasi ekson 12 JAK2 menurut BDS			
Positive (Positif)	3 (5,4%)	0	3 (1,4%)
Negative (Negatif)	53 (94,6%)	160 (100,0%)	213 (98,6%)
Status <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit			
Positive (Positif)	48 (85,7%)	6 (3,8%)	54 (25%)
Negative (Negatif)	8 (14,3%)	154 (96,3%)	162 (75%)

N: Jumlah pasien yang didiagnosis oleh peneliti (populasi yang dievaluasi).  
 Untuk setiap status mutasi, jumlah pasien dinyatakan sebagai jumlah absolut, dan sebagai persentase populasi yang dievaluasi (di antara tanda kurung).

**Tabel 20. Diagnosis PV akhir berdasarkan pendapat Peneliti yang diinformasikan oleh pengujian dua arah dan kriteria Organisasi Kesehatan Dunia 2008 menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit**

Diagnosis akhir oleh peneliti berdasarkan kriteria WHO dikombinasikan dengan penilaian JAK2 yang dilakukan oleh BDS			
Diagnosis akhir berdasarkan kriteria WHO dikombinasikan dengan penilaian JAK2 yang dilakukan oleh <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	PV (N=56)	Non-PV (N=160)	Total (N=216)
PV	53 (94,6%)	1 (0,6%)	54 (25%)
Non-PV	1 (1,8%)	153 (95,6%)	154 (71,3%)
Tidak meyakinkan	2 (3,6%)	6 (3,8%)	8 (3,7%)

N: Jumlah pasien yang didiagnosis oleh peneliti (populasi yang dievaluasi)  
 Angka dinyatakan sebagai jumlah absolut dan sebagai persentase populasi yang dievaluasi (dalam tanda kurung).

### Kasus yang tidak meyakinkan

Tiga subjek merupakan tipe liar untuk JAK2 V617F (keduanya dengan BDS dan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit), selain memiliki konsentrasi EPO serum rendah dan histologi sumsum tulang yang tidak meyakinkan (dua didiagnosis sebagai PV oleh peneliti dan satu sebagai non-PV). Lima subjek adalah tipe liar JAK2 V617F untuk BDS dan positif menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dan tidak ada pemeriksaan biopsi sumsum tulang yang dilakukan (kelimanya didiagnosis sebagai non-PV oleh peneliti). Meskipun tidak adanya atau histologi sumsum tulang yang tidak meyakinkan, delapan kasus ini dimasukkan dalam perhitungan spesifisitas dan sensitivitas (Tabel 21) sebagai tidak selaras.

Kasus-kasus yang tidak selaras

Untuk dua subjek, diagnosis peneliti berbeda dari diagnosis yang diperoleh menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dalam kriteria diagnostik WHO. Satu subjek memiliki kadar EPO serum dalam kisaran normal (pada 16,5 IU/l) dan tidak ada mutasi JAK2 V617F atau ekson 12. Namun, subjek didiagnosis menderita PV menurut pendapat peneliti. Satu subjek memiliki kadar EPO serum di bawah kisaran normal dan mutasi JAK2 V617F oleh BDS, tetapi diberi diagnosis non-PV menurut pendapat peneliti. Menurut protokol, diagnosis penyelidik seharusnya benar-benar mengikuti kriteria diagnostik WHO tahun 2008. Namun, dalam dua kasus yang tidak selaras ini, peneliti menggunakan kebijaksanaan klinis dalam menafsirkan algoritma.

Secara keseluruhan, seperti yang dirangkum dalam Tabel 21, sensitivitas diagnosis PV menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit adalah 94,64% (53/56 subjek; 95% CI: 85,13%, 98,88%), yang menunjukkan bahwa uji kadar ini diharapkan dapat mendeteksi PV pada sebagian besar subjek yang menderita penyakit tersebut. Demikian pula, spesifisitas diagnosis PV menggunakan uji kadar ini adalah 95,62% (153/160 subjek; 95% CI: 91,19%, 98,22%), menunjukkan bahwa hal ini juga diharapkan dapat menyingkirkan PV pada sebagian besar subjek tanpa PV.

Selain itu, nilai prediksi positif (positive predictive value, PPV) dan nilai prediksi negatif (negative predictive value, NPV) juga dihitung, PPV kit adalah 88,33% (53/60 subjek; 95% CI: 77,27%, 93,57%) dan NPV adalah 98,08% (153/156 subjek; 95% CI: 94,8%, 99,4%).

Tabel 21. Analisis sensitivitas, spesifisitas, PPV dan NPV (populasi yang dapat dievaluasi)

Variabel	Estimasi (%)	Batas keyakinan bawah 95% (%)	Batas keyakinan atas 95% (%)
Sensitivitas	94,64	85,13	98,88
Spesifisitas	95,62	91,19	98,22
PPV	88,33	77,27	93,57
NPV	98,08	94,8	99,4

Rasio kemungkinan pengujian negatif menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, untuk diagnosis PV, dalam kriteria diagnostik WHO adalah 21,6 (95% CI; 10,44, 44,71), yang menunjukkan bahwa hasil positif JAK2 V617F lebih mungkin terjadi pada subjek dengan PV daripada pada mereka yang tidak memiliki PV.

Rasio kemungkinan hasil pengujian positif menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, untuk diagnosis PV, dalam kriteria diagnostik WHO adalah 0,06 (95% CI; 0,02, 0,18), yang menunjukkan bahwa hasil negatif JAK2 V617F lebih kecil kemungkinannya terjadi pada subjek dengan PV dibandingkan dengan mereka yang tidak memiliki PV.

## Kesimpulan studi klinis

Kesimpulan berikut dapat diambil dari analisis tersebut:

- Sensitivitasnya adalah 94,64% (95% CI; 85,13%, 98,88%) yang menunjukkan bahwa *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dalam kriteria diagnostik WHO diharapkan dapat mendeteksi PV pada sebagian besar subjek yang menderita penyakit tersebut.
- Spesifisitas diagnosis PV menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dalam kriteria diagnostik WHO adalah 95,62% (95% CI; 91,19%, 98,22%), yang menunjukkan bahwa hal itu juga diharapkan dapat menyingkirkan PV pada sebagian besar subjek tanpa PV.
- Menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit dalam kriteria diagnostik WHO, PPV adalah 88,33% (95% CI; 77,27%, 93,57%)\* dan NPV sebesar 98,08% (95% CI; 94,8%, 99,4%).
- Rasio kemungkinan pengujian negatif menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, untuk diagnosis PV, dalam kriteria diagnostik WHO adalah 21,61 (95% CI; 10,44, 44,71), yang menunjukkan bahwa hasil positif JAK2 V617F lebih mungkin terjadi pada subjek dengan PV daripada pada mereka yang tidak memiliki PV.

\* PPV tergantung pada prevalensi. Karena prevalensi rendah pada populasi penelitian dan sensitivitas serta spesifisitas tidak tergantung pada prevalensi, maka sensitivitas dan spesifisitas menjadi lebih relevan.

- Rasio kemungkinan hasil pengujian positif menggunakan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, untuk diagnosis PV, dalam kriteria diagnostik WHO adalah 0,06 (95% CI; 0,02, 0,18), yang menunjukkan bahwa hasil negatif JAK2 V617F jauh lebih kecil kemungkinannya terjadi pada subjek dengan PV dibandingkan dengan mereka yang tidak memiliki PV.

## Ringkasan Keselamatan dan Kinerja

Ringkasan bagian keselamatan dan kinerja dapat diunduh dari halaman web produk *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit: [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623). Ini juga dapat ditemukan di situs web EUDAMED.

# Pembuangan

- Buang limbah sampel dan uji kadar sesuai dengan prosedur keselamatan setempat.
- Semua bahan biologis dan kimia berpotensi bahaya. Spesimen dan sampel berpotensi berbahaya dan harus diperlakukan sebagai bahan dengan bahaya hayati.
- Tabung sampel, pelat, dan limbah bekas selama ekstraksi DNA harus dibuang sesuai dengan peraturan keselamatan setempat.
- Tabung strip yang digunakan selama protokol qPCR harus dibuang sesuai dengan peraturan keselamatan setempat.

## Referensi

1. James C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144.
2. Levine R.L., et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387.
3. Kralovics R., et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 352, 1779.
4. Baxter E.J., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 36, 1054.
5. Vannuchi AM, Barbui T, Cervantes F, et al. Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26 Suppl 5:v85-99.
6. Tefferi A., et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 627.
7. Quintás-Cardama A. (2013) The role of Janus kinase 2 (JAK2) in myeloproliferative neoplasms: therapeutic implications. *Leuk Res. Apr*;37(4):465-72 .
8. Arber DA., et al. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*; 127:2391–405.
9. Barbui T. et al. (2011) Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 29:761–70.



10. Barosi G., et al. (2013) Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus project. *Blood*; 121:4778–81
11. Tefferi A., et al. (2013) Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report. *Blood*; 122:1395–8.
12. NCCN. NCCN Guidelines for Patients® | Myeloproliferative Neoplasms (2019.2 revision), 2nd ed.; 2019.
13. Langabeer SE, et al. (2015) Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol*; 95:270–9.
14. Lippert E., et al. (2014) Clinical and biological characterization of patients with low (0.1–2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica*. 99, e98.
15. Jovanovic J., et al (2013) Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2V617F associated myeloproliferative neoplasms: A joint European LeukemiaNet/MPN&MPN-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia* 27, 2032
16. National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT\_008413.
17. Tefferi A. and Vardiman J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, 22, 14.

# Panduan Pemecahan Masalah

Panduan pemecahan masalah ini dapat berguna dalam memecahkan masalah yang mungkin muncul. Untuk bantuan teknis dan informasi lebih lanjut, silakan kunjungi Pusat Dukungan Teknis kami di [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) (untuk informasi kontak, kunjungi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Untuk informasi pemecahan masalah yang berkaitan dengan kit ekstraksi QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (no. kat. 61104) dan QIAasympy DNA DSP Mini Kit (no. kat. 937236), silakan rujuk buku pegangan terkait; untuk informasi pemecahan masalah yang berkaitan dengan Rotor-Gene AssayManager v2.1, silakan rujuk *Panduan Pengguna Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Komentar dan saran

---

## Ekstraksi otomatis

- |   |   |
|---|---|
| a) Sampel ditandai sebagai “tidak jelas”    | Hal ini dapat terjadi karena adanya jeda selama proses ekstraksi. Jika proses ekstraksi telah selesai, lanjutkan ke langkah pengukuran rasio OD dan konsentrasi. Jika tidak, ulangi proses ekstraksi. |
| b) Sampel ditandai sebagai “belum diproses” | Ini mengacu pada kesalahan volume sampel awal. Verifikasi volume darah dengan pipet. Jika volumenya terlalu rendah, tingkatkan sehingga sampelnya menjadi 300 µl dan mulai lagi pengujian.            |
| c) Sampel ditandai sebagai “tidak valid”    | Terjadi kesalahan selama proses ekstraksi. Ulangi langkah ekstraksi untuk sampel ini.   |

## Komentar dan saran

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| d) Kesalahan suhu blok pendingin   | Pesan kesalahan di akhir proses tentang suhu pendinginan berarti sampel disimpan pada suhu ruangan (15–25 °C) sejak akhir proses ekstraksi. Jika sampel disimpan pada suhu ruangan selama <12 jam, kualitas DNA genomik tidak akan berubah dan DNA genomik dapat diukur. Jika >12 jam, sampel DNA genomik mungkin telah terdegradasi. Jika demikian, ulangi ekstraksi. |
| e) Kesalahan pelepasan pelat elusi | Di akhir proses, pesan kesalahan mungkin muncul jika pelat elusi dilepas tanpa memeriksa operasi relevan di layar. Hal ini dapat diperbaiki dengan mengklik kotak yang relevan.  |

Penanganan umum untuk penilaian status mutasi JAK2 menggunakan *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit*

Jumlah salinan total tidak sesuai dan sampel yang sesuai tidak valid: amplifikasinya terlalu rendah

- |  |  |
|--|--|
| a) Periksa rasio $A_{260}/A_{280}$                         | Jika hasilnya <1,7, lakukan ekstraksi DNA baru.  |
| b) Periksa konsentrasi DNA                                 | <i>ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit</i> dioptimalkan untuk konsentrasi kerja 10 ng/μl. Jika konsentrasi DNA tidak pada konsentrasi ini, encerkan atau ekstrak ulang DNA dari darah utuh. |
| c) Jika kedua parameter sesuai, volume pipet mungkin salah | Periksa dan kalibrasi ulang pipet sebelum mengulangi langkah qPCR.   |

### Kontrol proses gagal pada standar QS

- a) Pembalikan vial
- b) Inversi selama distribusi
- c) Kontaminasi silang
- d) Degradasi parsial standar
- e) Reagen PCR terdegradasi sebagian
- f) Amplifikasi nonspesifik )

Periksa skema pipet dan pengaturan reaksi. Ganti semua reagen kritis dan ulangi percobaan menggunakan alikuot baru. Selalu tangani sampel, komponen kit, dan bahan habis pakai sesuai dengan praktik yang diterima secara umum untuk mencegah kontaminasi limbah.

Simpan isi kit pada suhu -30 °C hingga -15 °C, dan jauhkan campuran reaksi dari cahaya.

Hindari pembekuan dan pencairan berulang.

### Tidak ada atau sinyal rendah untuk satu standar

- a) Masalah homogenitas
- b) Penggunaan campuran reaksi yang sama untuk WT dan MT QS

Periksa skema pipet dan pengaturan reaksi.

Ulangi proses PCR.

### Kontrol Tanpa Template (No Template Control, NTC) air menunjukkan amplifikasi positif

- a) Kontaminasi silang
- b) Kontaminasi reagen
- c) Inversi tabung strip (tabung berisi templat positif JAK2 V617F yang dimasukkan dalam posisi NTC)
- d) Degradasi kuar

Ganti semua reagen penting.

Selalu tangani sampel, komponen kit, dan bahan habis pakai sesuai dengan praktik yang diterima secara umum untuk mencegah kontaminasi limbah.

Periksa skema pipet dan pengaturan reaksi.

Jaga campuran reaksi agar terhindar dari cahaya.

Periksa positif palsu pada kurva fluoresens.

### Tidak ada sinyal, bahkan pada kontrol standar

Kesalahan pipet atau reagen yang terlewat

Periksa skema pipet dan pengaturan reaksi.

Ulangi proses PCR.

Sinyal tidak ada atau rendah dalam sampel untuk IC dan/atau jumlah salinan total (TCN) di bawah rentang validitas, tetapi kontrol proses valid

Efek penghambatan bahan sampel, disebabkan oleh pemurnian yang tidak memadai

Selalu periksa kualitas DNA dengan mengukur rasio dan konsentrasi  $A_{260}/A_{280}$  sebelum memulai.

Ulangi persiapan DNA.

Kontrol Tipe Liar (Wild-Type Control, WTC) positif, tetapi Kontrol Mutasi (Mutant Control, MTC) tidak cukup positif

Kontaminasi limbah

Ganti semua reagen penting.

Ulangi percobaan dengan bagian baru dari semua reagen.

Selalu tangani sampel, komponen kit, dan bahan habis pakai sesuai dengan praktik yang diterima secara umum untuk mencegah kontaminasi limbah.

Pastikan ujungnya diganti setiap kali memipet reagen yang berbeda.

Kontrol Tipe Liar (Wild-Type Control, WTC) yang diperkuat dengan campuran reaksi MT (bukan campuran reaksi WT) dan Kontrol Mutasi (Mutant Control, MTC) yang diperkuat dengan campuran reaksi WT (bukan campuran reaksi MT)

- a) Kontaminasi silang
- b) Kontaminasi reagen
- c) Inversi tabung (tabung berisi WTC dimasukkan ke posisi MTC dan sebaliknya)

Ganti semua reagen penting.

Ulangi percobaan dengan bagian baru dari semua reagen.

Selalu tangani sampel, komponen kit, dan bahan habis pakai sesuai dengan praktik yang diterima secara umum untuk mencegah kontaminasi limbah.

Periksa skema pipet dan pengaturan reaksi.

### Deteksi terbalik dari kontrol positif

- a) Kontaminasi silang
- b) Distribusi inversi campuran reaksi dalam tabung atau premix.

Ganti semua reagen kritis dan ulangi percobaan menggunakan alikuot baru. Selalu tangani sampel, komponen kit, dan bahan habis pakai sesuai dengan praktik yang diterima secara umum untuk mencegah kontaminasi limbah.

Periksa skema pipet dan pengaturan reaksi.

### Tidak ada sinyal untuk sampel atau kontrol, bahkan untuk kontrol internal













- a) Campuran reaksi atau salah satu komponennya (misalnya polimerase Taq) tidak ditambahkan
- b) Campuran reaksi terdegradasi

Periksa skema pipet dan pengaturan reaksi. Jika kontrol internal tidak diperkuat, campuran reaksi tidak ditambahkan atau terdegradasi.

Ulangi langkah qPCR dengan campuran reaksi baru.

# Simbol

Simbol berikut ini terdapat di petunjuk penggunaan atau pada kemasan dan label:

Simbol	Definisi simbol
 <N>	Berisi reagen yang cukup untuk reaksi <N>
	Gunakan sebelum
	Produk ini memenuhi persyaratan Peraturan Eropa 2017/746 untuk perangkat medis diagnostik in vitro.
	Perangkat medis diagnostik in vitro
	Nomor katalog
	Nomor lot
	Nomor materi (yaitu, pelabelan komponen)
	Nomor Barang Perdagangan Global
	Pengidentifikasi Unik Perangkat
	Mengandung
	Komponen
	Nomor

## Simbol

## Definisi simbol

Rn

R adalah untuk revisi Petunjuk Penggunaan dan n adalah nomor revisi



Batas suhu



Produsen



Baca petunjuk penggunaan yang dapat diunduh dari [resources.qiagen.com/674623](https://resources.qiagen.com/674623)



Lindungi dari cahaya



Perhatian, lihat dokumen pendukung



# Informasi Pemesanan

Produk	Isi	No. kat.
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	Untuk 24 reaksi: JAK2 Gene Control tipe liar, JAK2 V617F Control Gene, JAK2 WT Quant Standards, JAK2 MT Quant Standards, JAK2 WT Reaction Mix, JAK2 MT Reaction Mix, polimerase Taq DNA, dapar TE untuk pengenceran, air untuk NTC	674623
<div>Produk terkait</div> <div>Rotor-Gene Q MDx – untuk analisis real-time PCR yang divalidasi IVD dalam aplikasi klinis</div>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Siklus real-time PCR dan penganalisis High Resolution Melt dengan 5 saluran (hijau, kuning, oranye, merah, merah tua) ditambah saluran HRM, laptop, perangkat lunak, aksesoris, garansi 1 tahun untuk suku cadang dan tenaga kerja, pemasangan dan pelatihan tidak termasuk	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cycler real-time PCR dan penganalisis Pelelehan Resolusi Tinggi (High Resolution Melt, HRM) dengan 5 saluran (hijau, kuning, jingga, merah, merah tua) ditambah saluran HRM, komputer laptop, perangkat lunak, aksesoris, garansi 1 tahun untuk suku cadang dan tenaga kerja, pemasangan, dan pelatihan	9002033
Perangkat Lunak Rotor-Gene Assay Manager 2.1	Perangkat lunak untuk pengujian rutin dalam kombinasi dengan Rotor-Gene Q	9024203

Lisensi Rotor-Gene Assay Manager 2.1	Perangkat lunak lisensi tunggal untuk instalasi pada satu komputer	9025620
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Blok aluminium untuk pengaturan reaksi manual dengan pipet bersaluran tunggal dalam tabung 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 strip 4 tabung dan penutup untuk 1000 reaksi	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 strip 4 tabung dan penutup untuk 10.000 reaksi	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Untuk 50 penyiapan: Kolom Putar QIAamp Mini, Dapar, Reagen, Tabung, VacConnectors	61104
QIAasymphony DSP DNA Mini Kit	Untuk 192 penyiapan sebesar 200 µl masing-masing: Termasuk 2 kartrij reagen dan rak enzim serta aksesoris.	937236
<b>QIAasymphony SP dan aksesoris</b>		
QIAasymphony SP System	Modul persiapan sampel QIAasymphony: termasuk instalasi dan pelatihan, garansi 1 tahun untuk suku cadang dan tenaga kerja	9001751
QIAasymphony SP	Modul penyiapan sampel QIAasymphony: termasuk garansi 1 tahun untuk komponen dan tenaga kerja	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Kartrij penyiapan sampel 8 sumuran untuk digunakan dengan QIAasymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers untuk digunakan dengan QIAasymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Ujung Filter Sekali Pakai, dengan rak; (8 x 128). Untuk digunakan dengan instrumen QIAcube® dan QIAasymphony SP/AS	990332

Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Ujung Filter Sekali Pakai, dengan rak; (8 x 128). Untuk digunakan dengan instrumen QIAsymphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Tabung polipropilena nonsteril (kapasitas maksimum 0,85 ml, kapasitas penyimpanan kurang dari 0,7 ml, kapasitas elusi 0,4 ml); 2304 dalam rak berisi 96; termasuk strip tutup	19588
RNase A (17.500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 unit/ml, larutan)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml Tissue Lysis Buffer untuk 1000 sediaan	19076

Untuk informasi pelisensian terbaru dan penafian produk-spesifik, lihat Petunjuk Penggunaan kit QIAGEN. Petunjuk Penggunaan kit QIAGEN tersedia di [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) atau dapat diminta dari Layanan Teknis QIAGEN atau distributor lokal Anda.

# Riwayat Revisi Dokumen

Revisi	Deskripsi
R1, Juli 2022	Rilis awal

#### Perjanjian Lisensi Terbatas untuk *ipsogen*® JAK2 RGQ PCR Kit

Dengan menggunakan produk ini, setiap pembeli atau pengguna produk menyetujui ketentuan berikut:

1. Produk ini boleh digunakan hanya sesuai dengan protokol yang disertakan bersama produk dan Petunjuk Penggunaan ini, serta hanya boleh digunakan dengan komponen yang terdapat dalam panel saja. QIAGEN tidak memberikan lisensi apa pun berdasarkan kekayaan intelektualnya untuk menggunakan atau menggabungkan komponen yang tersedia dengan panel ini dengan komponen apa pun yang tidak termasuk dalam panel ini kecuali sebagaimana dijelaskan dalam protokol yang disediakan dengan produk, Petunjuk Penggunaan ini, dan protokol tambahan yang tersedia di [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Beberapa protokol tambahan ini telah disediakan oleh pengguna QIAGEN untuk pengguna QIAGEN. Protokol-protokol tersebut belum diuji secara menyeluruh atau dioptimalkan oleh QIAGEN. QIAGEN tidak memberikan garansi atau menjamin bahwa pihaknya tidak melanggar hak pihak ketiga.
2. Selain daripada lisensi yang dinyatakan secara tegas, QIAGEN tidak membuat jaminan bahwa kit ini dan/atau penggunaannya tidak melanggar hak-hak pihak ketiga.
3. Panel ini serta komponennya dilisensikan untuk penggunaan satu kali dan tidak boleh digunakan kembali, diperbarui, atau dijual kembali.
4. QIAGEN secara khusus menyanggah segala lisensi lain, yang dinyatakan secara tegas maupun tersirat selain yang dinyatakan secara tegas di atas.
5. Pembeli dan pengguna panel setuju untuk tidak mengambil atau mengizinkan orang lain mengambil langkah apa pun yang dapat menyebabkan atau mendukung tindakan apa pun yang dilarang di atas. QIAGEN dapat memberlakukan larangan Perjanjian Lisensi Terbatas ini di Pengadilan mana pun, dan akan memulihkan semua biaya investigasi dan Pengadilannya, termasuk biaya pengacara, dalam tindakan apa pun untuk menegakkan Perjanjian Lisensi Terbatas ini atau hak kekayaan intelektualnya yang terkait dengan panel dan/atau komponennya.

Untuk persyaratan lisensi yang diperbarui, lihat [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Merek Dagang: QIAGEN®, *ipsogen*®, QIAamp®, QIAcube®, QIAsymphony®, HotStarTaq®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co). Nama, merek dagang terdaftar, dll. yang digunakan di dalam dokumen ini, meskipun apabila tidak secara khusus ditandai sebagaimana demikian, tidak dianggap tidak dilindungi oleh undang-undang.

07/2022 HB-2872-001 1123592ID © 2022 QIAGEN, semua hak dilindungi undang-undang.

