

# Manuel du kit *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 *MutaSearch*<sup>®</sup>

Σ 24

Version 1

**IVD**

Diagnostics *in vitro* qualitatifs

À utiliser sur les appareils Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, Applied Biosystems<sup>®</sup>, ABI PRISM<sup>®</sup> et LightCycler<sup>®</sup>.



**REF**

673823



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

**R4**

**MAT**

1072502FR



## **QIAGEN : Sample and Assay Technologies**

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillons et d'analyses, permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services ultramodernes de grande qualité garantissent un succès total, de l'échantillon jusqu'au résultat.

### **QIAGEN fixe les normes en matière de :**

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines ;
- analyse d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche de microARN et interférence ARN ;
- automatisation des technologies d'échantillons et d'analyses.

Notre mission est de permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**.

# Contenu

<b>Utilisation prévue</b>	<b>4</b>
<b>Résumé et explication</b>	<b>4</b>
<b>Principe de la procédure</b>	<b>7</b>
<b>Matériel fourni</b>	<b>10</b>
Contenu du kit	10
<b>Matériel nécessaire mais non fourni</b>	<b>11</b>
<b>Avertissements et précautions</b>	<b>12</b>
Précautions générales	12
<b>Conservation et manipulation des réactifs</b>	<b>13</b>
<b>Procédure</b>	<b>14</b>
Préparation des échantillons d'ADN	14
Stockage des acides nucléiques	14
Protocoles	
■ Réalisation d'une qPCR sur un appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou Rotor-Gene Q 5plex HRM avec rotor de 72 tubes	15
■ Réalisation d'une qPCR sur un appareil Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT ou LightCycler 480	19
■ Réalisation d'une qPCR sur un LightCycler 1.2	24
<b>Interprétation des résultats</b>	<b>28</b>
Calcul de la valeur $\Delta\Delta C_T$ (ou $\Delta\Delta C_p$ ) et génotypage	28
Témoins	31
<b>Guide de résolution des problèmes</b>	<b>32</b>
<b>Contrôle qualité</b>	<b>34</b>
<b>Limites</b>	<b>34</b>
<b>Caractéristiques de performance</b>	<b>35</b>
Études non cliniques	35
Études cliniques	37
<b>Bibliographie</b>	<b>38</b>
<b>Symboles</b>	<b>39</b>
<b>Coordonnées</b>	<b>39</b>
<b>Pour commander</b>	<b>40</b>

## Utilisation prévue

Le kit *ipsogen JAK2 MutaSearch* est conçu pour la détection de la mutation JAK2 V617F/G1849T à partir d'ADN génomique de patients chez lesquels un néoplasme myéloprolifératif est suspecté. L'absence de la mutation JAK2 V617F/G1849T n'exclut pas la présence d'autres mutations JAK2. Ce test peut générer des résultats faux négatifs en cas de mutations supplémentaires localisées sur les nucléotides 88 504 à 88 622 (réf. NCBI : NT\_008413).

**Remarque** : le kit doit être utilisé selon les instructions données dans ce manuel, avec des réactifs et des appareils validés. Toute utilisation non conforme avec les informations portées sur l'étiquetage ou la notice de ce produit, et/ou modification quelconque de l'un de ses composants décharge QIAGEN de toute responsabilité.

## Résumé et explication

En 2005 (1–4) l'identification de V617F, une mutation somatique récurrente touchant le gène Janus tyrosine kinase 1, a constitué une avancée majeure dans la compréhension, la classification et le diagnostic des néoplasmes myéloprolifératifs (NMP). JAK2 est une molécule de signalisation intracellulaire essentielle pour de nombreuses cytokines, y compris l'érythropoïétine.

La mutation JAK2 V617F est détectée chez plus de 95 % des patients atteints de maladie de Vaquez (ou polyglobulie de Vaquez - PV), 50 à 60 % de ceux qui présentent une thrombocythémie essentielle (TE), et 50 % de ceux atteints de myélofibrose primitive (MFP). JAK2 V617F a également été observée dans quelques rares cas de leucémie myélomonocytaire chronique, de syndrome myélodysplasique, de mastocytose systémique et de leucémie neutrophile chronique, mais jamais dans le contexte d'une LMC (5).

Cette mutation correspond au changement d'un seul nucléotide en position 1849 de la séquence JAK2, situé dans l'exon 14, entraînant la substitution d'une valine (V) par une phénylalanine (F) en position 617 de la protéine (domaine JH2). Ceci entraîne l'activation constitutive de JAK2, une transformation hématopoïétique *in vitro*, et la pousse spontanée de colonies érythroïdes sans adjonction d'EPO (EEC) chez tous les patients qui présentent une PV et une grande partie de ceux atteints de TE et de MFP (6). La mutation JAK2 V617F constitue un facteur clé de la transformation des cellules hématopoïétiques dans les NMP, mais les mécanismes pathologiques exacts capables d'induire, à partir d'une même mutation unique, des entités cliniques et biologiques si différentes ne sont pas encore totalement élucidés.

Le diagnostic des NMP est généralement basé sur des critères cliniques, cytogénétiques et histologiques de la moelle osseuse. La découverte d'un marqueur moléculaire, spécifique à une maladie, a permis de simplifier le processus de diagnostic ainsi que d'améliorer sa précision. La détection de la

mutation JAK2 V617F fait désormais partie des critères de référence de l'OMS 2008 pour le diagnostic des NMP BCR-ABL négatifs (tableau 1) et sa présence constitue un critère majeur pour la confirmation du diagnostic.

**Tableau 1. Critères de l'OMS pour le diagnostic des NMP (adaptés d'après la référence 7)**

Critères diagnostiques de la polyglobulie de Vaquez (PV)	
Majeur	<p>1. Hémoglobine (Hgb) &gt; 18,5 g/dl<sup>-1</sup> (hommes) ou &gt; 16,5 g/dl<sup>-1</sup> (femmes), ou  Hgb ou hématocrite (Hct) &gt; 99<sup>e</sup> centile de la plage de référence associée à l'âge, au sexe ou à l'altitude de résidence, ou  Hgb &gt; 17 g/dl<sup>-1</sup> (hommes) ou &gt; 15 g/dl<sup>-1</sup> (femmes) si associée à une augmentation importante ≥ 2 g/dl<sup>-1</sup> par rapport aux valeurs de référence ne pouvant être attribuée à la correction d'une carence en fer, ou  Masse érythrocytaire élevée &gt; 25 % supérieure à la valeur théorique normale moyenne.</p> <p>2. Présence de la mutation <i>JAK2 V617F</i> ou similaire.</p>
Mineur	<p>1. Myéloprolifération impliquant les 3 lignées hématopoïétiques sur la biopsie ostéomédullaire.  2. Taux d'érythropoïétine sérique au-dessous des valeurs normales de référence.  3. Pousse de colonies érythroïdes endogènes (EEC).</p>
Critères diagnostiques de la thrombocythémie essentielle (TE)	
Majeur	<p>1. Numération des plaquettes ≥ 450 x 10<sup>9</sup> l<sup>-1</sup>.  2. Prolifération de mégacaryocytes ayant une grande taille et une morphologie mature.  Prolifération érythroïde ou granulocytaire discrète ou absente.  3. Non réponse aux critères de l'OMS pour le diagnostic d'une leucémie myéloïde chronique (LMC), d'une PV, d'une myélofibrose primitive (MFP), d'un syndrome myélodysplasique (SMD) ou de tout autre néoplasme myéloïde.</p> <p>4. Présence de la mutation <i>JAK2 V617F</i> ou de tout autre marqueur de clonalité, ou  absence de signes de thrombocytose réactionnelle.</p>
Mineur	-
Critères diagnostiques de la myélofibrose primitive (MFP)	
Majeur	<p>1. Prolifération de mégacaryocytes avec atypies et fibrose réticulinique et/ou collagénique, ou  En l'absence de fibrose réticulinique, les modifications des mégacaryocytes doivent être accompagnées d'une augmentation de la cellularité, d'une hyperplasie granuleuse et souvent d'une diminution de l'érythropoïèse (c'est-à-dire MFP préfibrotique).  2. Non réponse aux critères de l'OMS pour une LMC, une PV, un SMD ou tout autre néoplasme myéloïde.</p> <p>3. Présence de la mutation <i>JAK2 V617F</i> ou de tout autre marqueur de clonalité, ou</p>

Aucun signe de fibrose médullaire réactionnelle.

- Mineur
1. Leuco-érythroblastose.
  2. Élévation du taux lactate déshydrogénase sérique (LDH).
  3. Anémie.
  4. Splénomégalie palpable.

De plus, les experts européens et américains sont de plus en plus nombreux à appuyer la valeur seuil de positivité clinique de 1 % des tests basés sur la PCR (8-10).

## Principe de la procédure

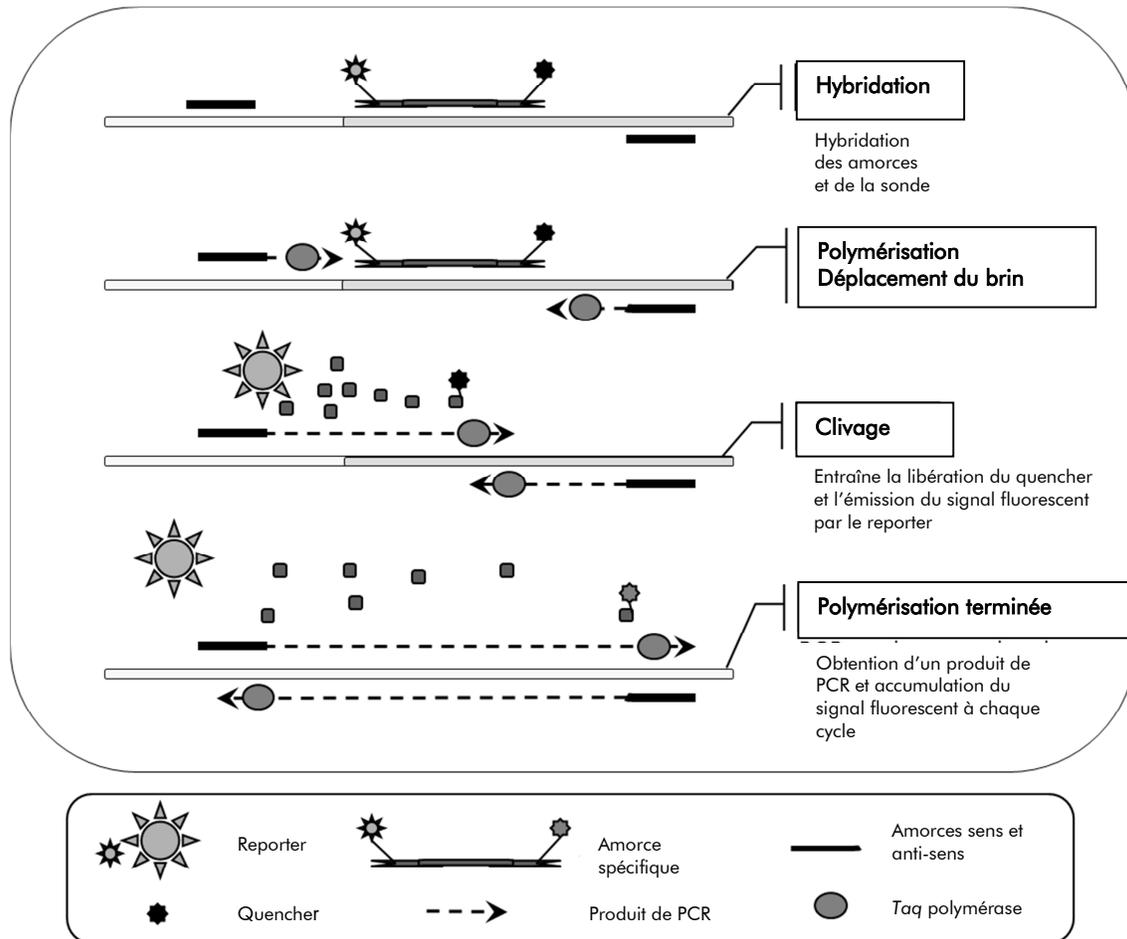
La qPCR permet une quantification précise des produits de PCR lors de la phase exponentielle du processus d'amplification par PCR. Les données de qPCR peuvent être rapidement obtenues sans procédure post-PCR par détection en temps réel de signaux fluorescents durant et/ou immédiatement après le cycle de PCR, ce qui réduit considérablement le risque de contamination des produits de PCR. Il existe actuellement 3 principales techniques de qPCR : l'analyse qPCR qui utilise le marqueur SYBR Green I<sup>®</sup>, celle qui utilise l'hydrolyse des sondes, et celle qui utilise l'hybridation des sondes.

Ce test exploite le principe de la qPCR par hydrolyse des oligonucléotides doublement marqués. Au cours de la PCR, les amorces sens et anti-sens sont hybridées à une séquence spécifique. Ce mélange contient également un oligonucléotide doublement marqué. Cette sonde, composée d'un oligonucléotide marqué avec un marqueur de fluorescence (reporter) 5' et un chélateur de fluorescence (quencher) 3' en aval, s'hybride à une séquence cible au sein du produit de PCR. L'analyse qPCR au moyen des sondes hydrolysées exploite l'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase *Thermus aquaticus* (Taq). Quand la sonde est intacte, la proximité du reporter et du quencher entraîne la suppression de la fluorescence du reporter, essentiellement en raison d'un transfert d'énergie de type Förster.

Durant la PCR, si la cible d'intérêt est présente, la sonde se fixe spécifiquement entre les sites où sont hybridées les amorces sens et anti-sens. L'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase clive la sonde entre le reporter et le quencher si celle-ci est hybridée à la cible. Les fragments de sonde sont alors déplacés de la cible et la polymérisation du brin se poursuit. L'extrémité 3' de la sonde est bloquée pour empêcher l'extension de cette dernière au cours de la PCR (figure 1). Ce processus intervient à chaque cycle et n'interfère pas avec l'accumulation exponentielle du produit.

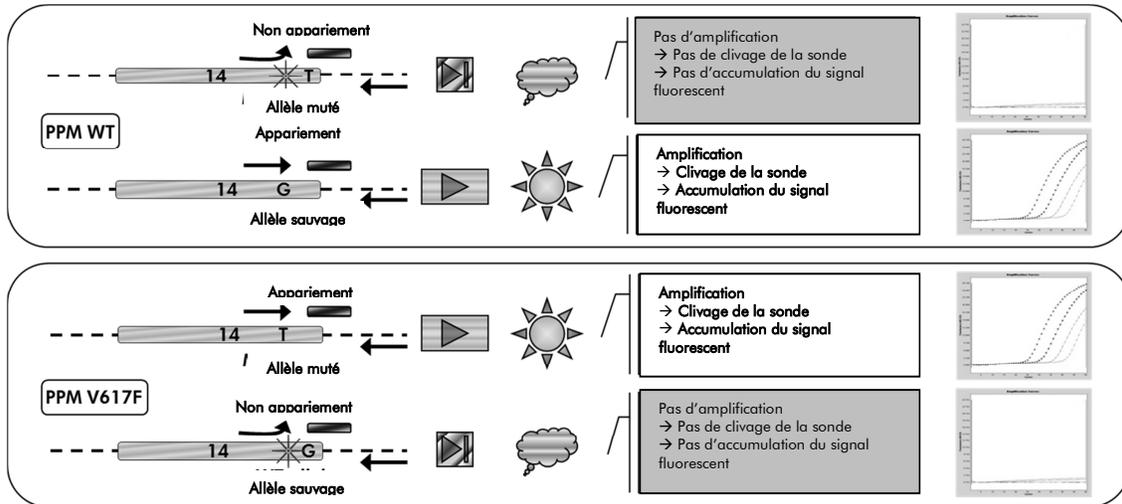
L'augmentation du signal fluorescent n'est détectée que si la séquence cible est complémentaire de la sonde et donc amplifiée durant la PCR. Du fait de ces exigences, l'amplification non spécifique n'est pas détectée. Ainsi,

l'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à l'amplification de la cible durant la PCR.



**Figure 1. Principe de la réaction.**

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



**Figure 2. PCR spécifique d'un allèle.** L'utilisation d'un mélange sonde et amorces sauvage ou V617F permet la détection spécifique de l'allèle sauvage ou de l'allèle muté en deux réactions distinctes pour le même échantillon.

## Matériel fourni

### Contenu du kit

<b>ipsogen JAK2 MutaSearch Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Référence</b>		<b>673823</b>
<b>Nombre de réactions</b>		<b>24</b>
V617F Positive Control (Témoin positif V617F)	PC-VF JAK2	40 $\mu$ l
V617F Negative Control (Témoin négatif V617F)	NC-VF JAK2	40 $\mu$ l
Cut-Off Sample (1% V617F allèle)	COS-VF JAK2	40 $\mu$ l
Primers and Probe Mix JAK2 V617F (Mélange sonde et amorces JAK2 V617F)*	PPM-JAK2 V617F 25x	68 $\mu$ l
Primers and probe mix JAK2 WT (Mélange sonde et amorces JAK2 sauvage) <sup>†</sup>	PPM-JAK2 WT 25x	68 $\mu$ l
ipsogen JAK2 MutaSearch Kit Handbook (anglais)		1

\* Mélange d'amorces sens et anti-sens spécifiques au gène *JAK2*, sonde FAM™-TAMRA™ spécifique à V617F.

<sup>†</sup> Mélange d'amorces sens et anti-sens pour le gène *JAK2*, sonde FAM-TAMRA spécifique au gène sauvage.

**Remarque :** centrifuger brièvement les tubes avant utilisation.

**Remarque :** l'analyse d'échantillons inconnus à l'aide du kit ipsogen JAK2 MutaSearch implique l'extraction d'ADN génomique. Les réactifs nécessaires pour réaliser cette opération ne sont pas fournis et doivent être validés pour une utilisation avec le présent kit.

## Matériel nécessaire mais non fourni

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

### Réactifs

- Eau exempte de nucléase pour PCR
- Tampon TE 1x exempt de nucléase, de pH 8
- Tampon et ADN polymérase *Taq* : les réactifs validés sont TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (mélange maître PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., réf. 4304437) et LightCycler TaqMan Master (mélange maître PCR 5x) (Roche, réf. 04535286001) ou LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe<sup>®</sup> (mélange maître 5x) (Roche, réf. 03515567001).

**Remarque** : ce mélange maître ne peut être utilisé que sur un LightCycler 1.2

- Réactif pour gel d'agarose à 0,8-1 % dans un tampon pour électrophorèse TBE 0,5x.

### Consommables

- Cônes de pipette pour PCR avec filtre hydrophobe, stériles, exempts de nucléase et aérosol-résistants
- Tubes pour PCR exempts de RNase et de DNase de 0,5 ou 1,5 ml
- Glace

### Équipement

- Pipettes microlitre\* spéciales PCR (1–10  $\mu$ l ; 10–100  $\mu$ l ; 100–1 000  $\mu$ l)
- Micro-centrifugeuse\* avec rotor pour tubes de réaction de 0,5 ml/1,5 ml (capable d'atteindre les 10 000 tpm)
- Spectrophotomètre\* pour la quantification de l'ADN
- Système de PCR en temps réel :\* Rotor-Gene Q 5plex HRM ou autres séquenceurs Rotor-Gene Q MDx, LightCycler 1.2 ou 480 ; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ou ABI PRISM 7900HT SDS, et matériel spécifique associé.

\* S'assurer que tous les instruments sont vérifiés et calibrés selon les recommandations du fabricant.

## Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*

En cas de manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF (pratique et compact) à l'adresse [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) où vous pouvez trouver, consulter et imprimer les SDS pour chaque kit et élément de kit QIAGEN.

Mettre au rebut les déchets d'échantillons et de tests conformément aux règles de sécurité locales.

### Précautions générales

Les tests de qPCR nécessitent la mise en place de bonnes pratiques de laboratoire, incluant la maintenance de l'équipement, spécifiques à la biologie moléculaire et en accord avec les réglementations applicables et les normes pertinentes.

Ce kit est destiné au diagnostic *in vitro*. Les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été validés pour obtenir des performances optimales. Des dilutions supplémentaires des réactifs ou une modification des temps d'incubation et des températures peuvent engendrer des données aberrantes ou erronées. Les réactifs PPM-JAK2 peuvent être altérés s'ils sont exposés à la lumière. Tous les réactifs sont formulés spécifiquement pour être utilisés dans le cadre de ce test. Pour garantir les performances optimales du test, aucune substitution ne doit être faite.

Prendre des précautions afin de prévenir :

- les contaminations par les DNases, qui peuvent causer la dégradation de la matrice d'ADN.
- toute contamination croisée par l'ADN ou les produits de PCR susceptible de générer des signaux faux positifs.

Nous recommandons par conséquent :

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

préférence dans une autre pièce) avec du matériel dédié (pipettes, cônes, etc.).

## Conservation et manipulation des réactifs

Les kits sont expédiés en carboglace et doivent être stockés entre -30 °C et -15 °C à réception.

- Limiter l'exposition des mélanges sonde et amorces à la lumière (tubes PPM-JAK2).
- Mélanger et centrifuger doucement les tubes avant leur ouverture.
- Stocker tous les composants du kit dans leur contenant d'origine.

Ces conditions de stockage s'appliquent aux composants ouverts ou non. Tous les composants stockés dans des conditions autres que celles mentionnées sur l'étiquetage peuvent ne pas fonctionner correctement et affecter les résultats des tests.

Les dates de péremption de chaque réactif sont mentionnées sur les étiquettes individuelles de chaque composant. Dans des conditions de stockage adéquates, le produit conservera ses performances jusqu'à la date imprimée sur l'étiquetage.

Il n'y a pas de signe visible indiquant une chute de stabilité du produit. Cependant les témoins positifs et négatifs doivent être analysés systématiquement en parallèle de l'échantillon à quantifier.

## Procédure

### Préparation des échantillons d'ADN

L'ADN génomique peut être obtenu à partir de sang total, de lymphocytes purifiés du sang périphérique, de cellules polynucléaires ou de granulocytes. Il est recommandé de conserver le même type de fraction cellulaire ainsi que la même méthode d'extraction de l'ADN pour être en mesure de comparer les résultats. L'extraction d'ADN peut être effectuée via une méthode « maison » ou commerciale.

La quantité d'ADN est déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm. La qualité de l'ADN peut être vérifiée par spectrophotométrie ou par électrophorèse sur gel

Le ratio  $O_{260}/O_{280}$  doit être compris entre 1,7 et 1,9. Un ratio inférieur indique habituellement une contamination par une protéine ou des produits chimiques organiques. L'analyse électrophorétique sur gel contenant 0,8-1 % d'agarose doit permettre d'identifier l'ADN isolé sous la forme d'une bande distincte d'environ 20kb. Une étendue plus fine est acceptable.

L'ADN produit est dilué à 5 ng/ $\mu$ l dans du tampon TE. Les échantillons contenant 25 ng d'ADN génomique purifié offrent une réaction de qPCR optimale.

### Stockage des acides nucléiques

Pour un stockage à court terme d'une durée maximale de 24 heures, nous conseillons de stocker les acides nucléiques purifiés à une température comprise entre 2 et 8 °C. Pour un stockage à long terme de plus de 24 heures, nous conseillons de les stocker à -20 °C.

## Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou Rotor-Gene Q 5plex HRM avec rotor de 72 tubes

Avec ces appareils, il est recommandé de dupliquer toutes les mesures, comme indiqué dans le tableau 2.

**Tableau 2. Nombre de réactions sur les appareils Rotor-Gene Q avec rotor de 72 tubes**

Échantillons	Réactions
<b>Avec le mélange sonde et amorces JAK2 V617F (PPM-JAK2 V617F)</b>	
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
3 ADN témoins	6 réactions (PC-VF, NC-VF et COS-VF, chacun testé en double)
Contrôle H <sub>2</sub> O	2 réactions
<b>Avec le mélange sonde et amorces JAK2 sauvage (PPM-JAK2 WT)</b>	
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
3 ADN témoins	6 réactions (PC-VF, NC-VF et COS-VF, chacun testé en double)
Contrôle H <sub>2</sub> O	2 réactions

### Analyse des échantillons sur un appareil Rotor-Gene® Q avec rotor de 72 tubes

Il est recommandé de tester au moins 12 échantillons d'ADN au cours de la même expérience afin d'optimiser l'utilisation des témoins et des mélanges sonde et amorces. Le schéma de rotor représenté par la figure 3 montre un exemple d'une telle expérience.



Les composants doivent être retirés du congélateur environ 10 min avant le début de la procédure.

2. **Passer au vortex et centrifuger brièvement tous les tubes (pendant environ 10 s, à 10 000 tpm pour recueillir le liquide dans le fond du tube).**
3. **Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser :**

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 3 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25  $\mu$ l. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à l'aide du même mélange sonde et amorces. Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

**Tableau 3. Préparation des mélanges de qPCR**

<b>Composant</b>	<b>1 réaction (<math>\mu</math>l)</b>	<b>VF : 32 + 1 réactions (<math>\mu</math>l)</b>	<b>WT : 32 + 1 réactions (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentration finale</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Mélange sonde et amorces, 25x (VF ou WT, respectivement)	1	33	33	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	214,5	214,5	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 6)	5	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	25	25 chacun	25 chacun	–

4. **Passer au vortex et centrifuger brièvement chaque mélange de qPCR (VF et WT) (pendant environ 10 s, à 10 000 tpm, pour recueillir le liquide dans le fond du tube).**

5. Déposer 20  $\mu$ l de pré-mélange qPCR correspondant (VF ou WT) par tube.
6. Ajouter 5  $\mu$ l de l'échantillon d'ADN ou de témoin dans le tube correspondant (volume total 25  $\mu$ l).
7. Mélanger doucement en pipetant.
8. Fermer les tubes de PCR. Placer les tubes dans le rotor de 72 tubes en suivant les recommandations du fabricant. Compléter toutes les autres positions avec des tubes vides.
9. Paramétrer le programme de thermocyclage du Rotor-Gene Q comme indiqué dans le tableau 4.

**Tableau 4. Profil de température**

<b>Mode d'analyse :</b>	Quantitation
<b>Maintien</b>	Température : 50 °C Durée : 2 min
<b>Maintien 2</b>	Température : 95 °C Durée : 10 min
<b>Cyclage</b>	50 fois 95 °C pendant 15 s 62 °C pendant 1 min pour l'acquisition de la fluorescence FAM dans le canal Green : Single

10. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 4.
11. Sur un appareil Rotor-Gene Q, sélectionner le paramètre d'analyse « Slope Correct » (Correction de la pente). Il est recommandé de définir la valeur de seuil à 0,03.

## Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT ou LightCycler 480

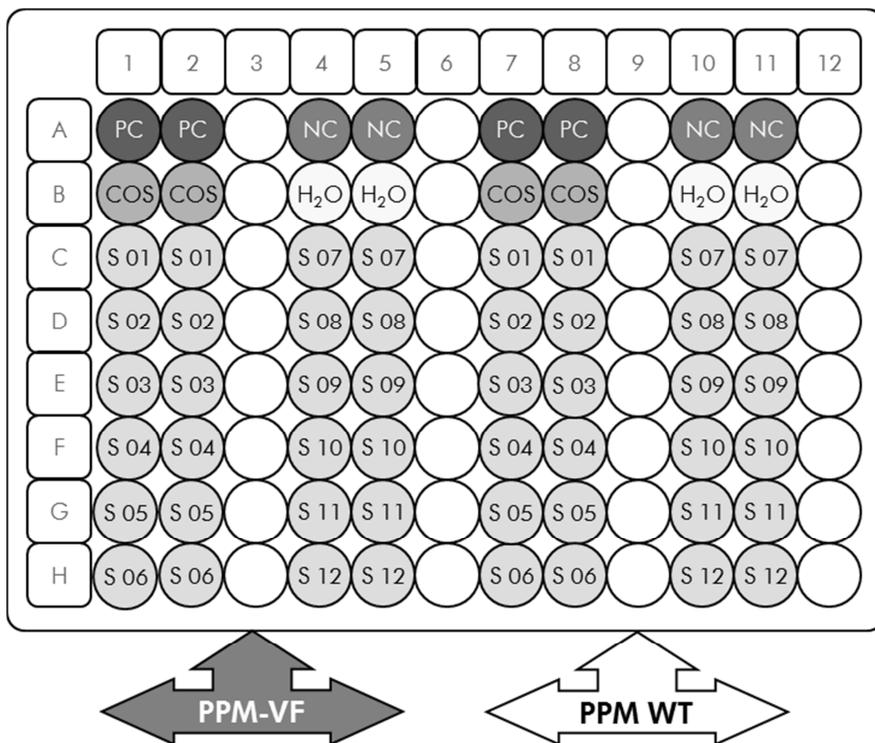
En cas d'utilisation d'un appareil de qPCR à plaque de 96 puits, il est recommandé de dupliquer toutes les mesures, comme indiqué dans le tableau 5.

**Tableau 5. Nombre de réactions sur un appareil Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT ou LightCycler 480**

Échantillons	Réactions
<b>Avec le mélange sonde et amorces JAK2 V617F (PPM-JAK2 V617F)</b>	
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
3 ADN témoins	6 réactions (PC-VF, NC-VF et COS-VF, chacun testé en double)
Contrôle H <sub>2</sub> O	2 réactions
<b>Avec le mélange sonde et amorces JAK2 sauvage (PPM-JAK2 WT)</b>	
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
3 ADN témoins	6 réactions (PC-VF, NC-VF et COS-VF, chacun testé en double)
Contrôle H <sub>2</sub> O	2 réactions

### Analyse des échantillons sur un appareil Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT ou LightCycler 480

Il est recommandé de tester au moins 12 échantillons d'ADN au cours de la même expérience afin d'optimiser l'utilisation des témoins et des mélanges sonde et amorces. Le schéma de plaque représenté par la figure 4 montre un exemple d'une telle expérience.



**Figure 4. Suggestion de configuration de plaque pour une expérience réalisée à l'aide du kit *ipsogen JAK2 MutaSearch*. PC : témoin positif ; NC : témoin négatif ; COS : échantillon Cut-off ; S : échantillon d'ADN ; H<sub>2</sub>O : contrôle H<sub>2</sub>O.**

### Réalisation d'une qPCR sur un appareil Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT ou LightCycler 480

**Remarque :** réaliser toutes les étapes sur la glace.

#### Procédure

**1. Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.**

Les composants doivent être retirés du congélateur environ 10 min avant le début de la procédure.

**2. Passer au vortex et centrifuger brièvement tous les tubes (pendant environ 10 s, à 10 000 tpm pour recueillir le liquide dans le fond du tube).**

**3. Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser :**

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 6 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 µl. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à

l'aide du même mélange sonde et amorces. Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

**Tableau 6. Préparation du mélange de qPCR**

<b>Composant</b>	<b>1 réaction (<math>\mu</math>l)</b>	<b>VF : 32 + 1 réactions (<math>\mu</math>l)</b>	<b>WT : 32 + 1 réactions (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentration finale</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Mélange sonde et amorces, 25x (VF ou WT, respectivement)	1	33	33	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	214,5	214,5	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 6)	5	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	25	25 chacun	25 chacun	–

4. **Passer au vortex et centrifuger brièvement chaque mélange de qPCR (VF et WT) (pendant environ 10 s, à 10 000 tpm, pour recueillir le liquide dans le fond du tube).**
5. **Déposer 20  $\mu$ l de pré-mélange qPCR correspondant (VF ou WT) par puits.**
6. **Ajouter 5  $\mu$ l de l'échantillon d'ADN ou de témoin dans le puits correspondant (volume total 25  $\mu$ l).**
7. **Mélanger doucement en pipetant.**
8. **Fermer la plaque et centrifuger brièvement (300 x g, pendant environ 10 s)**
9. **Placer la plaque dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant.**
10. **Paramétrer le programme de thermocyclage tel qu'indiqué dans le tableau 7 pour les appareils Applied Biosystems 7500 et ABI PRISM**

**7900HT SDS ou conformément au tableau 8 en cas d'utilisation d'un LightCycler 480.**

**Tableau 7. Profil de température pour un appareil Applied Biosystems 7500 ou ABI PRISM 7900HT SDS**

<b>Mode d'analyse :</b>	Courbe standard - Quantification absolue
<b>Maintien</b>	Température : 50 °C Durée : 2 min
<b>Maintien 2</b>	Température : 95 °C Durée : 10 min
<b>Cyclage</b>	50 fois 95 °C pendant 15 s 63 °C pendant 1 min et 30 s avec acquisition de la fluorescence FAM : Single ; quencher : TAMRA

**Tableau 8. Profil de température pour le LightCycler 480**

<b>Mode d'analyse :</b>	Quantification absolue (« Abs Quant »)
<b>Formats de détection</b>	Sélectionner « Simple Probe » (Sonde simple) dans la fenêtre « Detection formats ».
<b>Maintien</b>	Température : 50 °C Durée : 2 min
<b>Maintien 2</b>	Température : 95 °C Durée : 10 min
<b>Cyclage</b>	50 fois 95 °C pendant 15 s 63 °C pendant 1 min et 30 s avec acquisition de la fluorescence FAM correspondant à (483 nm – 533 nm) pour le LC version 01 et (465 nm - 510 nm) pour le LC version 02. Single

**11. Pour les appareils Applied Biosystems 7500 et ABI PRISM 7900HT SDS, suivre l'étape 11a. Pour le LightCycler 480, se référer à l'étape 11b.**

- 11a. Applied Biosystems 7500 et ABI PRISM 7900HT SDS : lors de l'analyse, il est recommandé de définir le seuil à 0,1. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 7.**
- 11b. LightCycler 480 : il est recommandé de recourir au mode d'analyse « Fit point » avec bruit de fond à 2,0 et seuil à 2,0. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 8.**

## Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un LightCycler 1.2

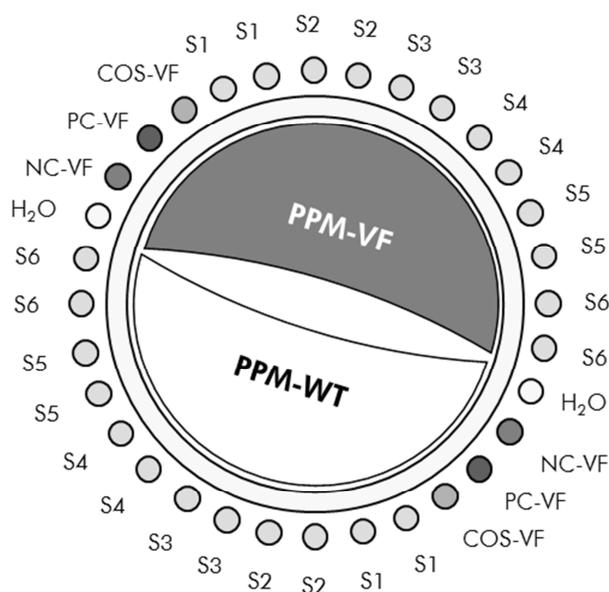
En cas d'utilisation de séquenceurs capillaires, il est recommandé de mesurer les échantillons en double, et les témoins en simple exemplaire, tel qu'indiqué dans le tableau 9.

**Tableau 9. Nombre de réactions pour le LightCycler 1.2**

Échantillons	Réactions
<b>Avec le mélange sonde et amorces JAK2 V617F (PPM-JAK2 V617F)</b>	
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
3 ADN témoins	3 réactions (PC-VF, NC-VF et COS-VF, chacun testé une fois)
Contrôle H <sub>2</sub> O	1 réaction
<b>Avec le mélange sonde et amorces JAK2 sauvage (PPM-JAK2 WT)</b>	
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
3 ADN témoins	3 réactions (PC-VF, NC-VF et COS-VF, chacun testé une fois)
Contrôle H <sub>2</sub> O	1 réaction

### Analyse des échantillons sur un LightCycler 1.2

Il est recommandé de tester 6 échantillons d'ADN au cours de la même expérience afin d'optimiser l'utilisation des témoins et des mélanges sonde et amorces. Le schéma représenté par la figure 5 montre un exemple d'une telle expérience.



**Figure 5. Suggestion de configuration du rotor pour une expérience réalisée à l'aide du kit ipsogen JAK2 MutaSearch.** PC-VF : témoin positif ; NC-VF : témoin négatif ; COS-VF : échantillon Cut-off ; S : échantillon d'ADN ; H<sub>2</sub>O : contrôle H<sub>2</sub>O.

## Réalisation d'une qPCR sur un LightCycler 1.2

**Remarque** : en raison d'exigences technologiques particulières, les expériences sur LightCycler 1.2 doivent être réalisées en utilisant des réactifs spécifiques. Il est recommandé d'utiliser le réactif LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe et de se conformer aux instructions du fabricant pour la préparation du mélange maître 5x.

**Remarque** : réaliser toutes les étapes sur la glace.

### Procédure

#### 1. Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.

Les composants doivent être retirés du congélateur environ 10 min avant le début de la procédure.

#### 2. Passer au vortex et centrifuger brièvement tous les tubes (pendant environ 10 s, à 10 000 tpm pour recueillir le liquide dans le fond du tube).

#### 3. Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser :

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 10 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 20 µl. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à

l'aide du même mélange sonde et amorces. Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

**Tableau 10. Préparation du mélange de qPCR**

Composant	1 réaction (µl)	VF :	WT :	Concentration finale
		16 + 1 réactions (µl)	16 + 1 réactions (µl)	
LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> HybProbe, 5x	4	68	68	1x
Mélange sonde et amorces, 25x (VF ou WT, respectivement)	0,8	13,6	13,6	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	10,2	173,4	173,4	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 6)	5	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	20	20 chacun	20 chacun	–

4. Passer au vortex et centrifuger brièvement chaque mélange de qPCR (VF et WT) (pendant environ 10 s, à 10 000 tpm, pour recueillir le liquide dans le fond du tube).
5. Déposer 15 µl de pré-mélange qPCR correspondant (VF ou WT) par capillaire.
6. Ajouter 5 µl de l'échantillon d'ADN ou de témoin dans le capillaire correspondant (volume total 20 µl).
7. Mélanger doucement en pipetant.

8. Fermer les capillaires et centrifuger brièvement (500 x g, pendant environ 5 s)
9. Placer les capillaires dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant.
10. Paramétrer le programme de thermocyclage du LightCycler 1.2 comme indiqué dans le tableau 11.

**Tableau 11. Profil de température**

<b>Mode d'analyse :</b>	Quantification
<b>Maintien</b>	Température : 95 °C Durée : 10 min
<b>Cyclage</b>	50 fois 95 °C pendant 15 s 66 °C pendant 1 min avec acquisition de la fluorescence FAM : Single

11. Avec un séquenceur LightCycler 1.2, l'utilisation du mode F1/F2 et « 2<sup>nd</sup> derivative analysis » (2<sup>e</sup> analyse dérivative) est recommandée. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 11.

# Interprétation des résultats

## Calcul de la valeur $\Delta\Delta C_T$ (ou $\Delta\Delta C_p$ ) et génotypage

Extraire les données exportées du fichier d'export pour analyse généré par le système, et analyser les résultats tel que décrit ci-dessous.

**Remarque** : les valeurs  $C_T$  correspondent aux résultats obtenus sur les systèmes Rotor-Gene, Applied Biosystems, et ABI PRISM. Les valeurs  $C_p$ , générées par les systèmes LightCycler, peuvent être remplacées par les valeurs  $C_T$  dans la description ci-dessous. Les calculs, présentés pour des valeurs  $C_T$ , s'appliquent donc également aux valeurs  $C_p$ .

**IMPORTANT** : si aucune amplification n'est observée (c'est-à-dire, si l'appareil affiche le résultat « undetected » (« non détecté »,  $C_T > 45$ , ou  $C_p > 45$ , en fonction du système utilisé) pour PPM-JAK2 WT et PPM-JAK2 VF, les résultats ne peuvent pas être utilisés. Ces résultats indiquent que la concentration d'ADN dans l'échantillon n'est pas adéquate ou que la matrice ADN a été omise. Sinon, procéder à l'analyse comme décrit ci-après.

### Procédure

1. **Calculer la valeur moyenne  $C_T$  obtenue pour PPM-JAK2 V617F ( $C_T$  VF moyenne) et PPM-JAK2 WT ( $C_T$  WT moyenne) pour chaque échantillon (témoins, échantillon Cut-Off et échantillons inconnus).**

Si une valeur « undetermined » (« indéterminé ») est associée à l'un des répliquats d'un échantillon, ne pas en tenir compte, et utiliser uniquement les valeurs obtenues pour les autres répliquats. Dans ce cas, il est vivement recommandé de réanalyser l'échantillon.

Si les deux répliquats sont indéterminés, définir la valeur de l'échantillon à 45.

2. **Calculer la limite de charge (input limit - IL) d'après le schéma ci-dessous.**

Limite de charge (IL) =  $C_T$  WT moyenne pour COS + 3,3

**Remarque** : la limite de charge permet de vérifier que l'échantillon d'ADN de patient utilisé pour le test a été correctement manipulé afin de garantir la fiabilité des résultats finaux pour le statut de JAK2 V617F.

**3. Vérifier la qualité de chaque échantillon inconnu tel que décrit dans le tableau 12.**

**Table 12. Critères de qualité des échantillons**

<b>Si :</b>	<b>Alors :</b>
$C_T$ VF moyenne < 40 :	Passer à l'étape 4.
$C_T$ VF moyenne $\geq$ 40 <b>et</b> $C_T$ WT moyenne < IL	Passer à l'étape 4.
$C_T$ VF moyenne $\geq$ 40 <b>et</b> $C_T$ WT moyenne $\geq$ IL	L'échantillon ne peut pas être analysé.*

\* La concentration d'ADN de l'échantillon n'est pas adéquate ou la matrice ADN a été omise.

**4. Calculer la valeur  $\Delta C_T$  pour tous les échantillons valides ( $\Delta C_{T \text{ Sample}}$ ) et les témoins ( $\Delta C_{T \text{ PC-VF}}$ ,  $\Delta C_{T \text{ NC-VF}}$  et  $\Delta C_{T \text{ COS}}$ ) d'après la formule ci-dessous.**

$$\Delta C_T = C_T \text{ VF moyenne} - C_T \text{ WT moyenne}$$

**5. Calculer la valeur  $\Delta \Delta C_T$  pour chaque échantillon inconnu ( $\Delta \Delta C_{T \text{ Sample}}$ ) et chaque témoin ( $\Delta \Delta C_{T \text{ PC-VF}}$  et  $\Delta \Delta C_{T \text{ NC-VF}}$ ) d'après les formules ci-dessous.**

$$\Delta \Delta C_{T \text{ Sample}} = \Delta C_{T \text{ COS}} - \Delta C_{T \text{ Sample}}$$

$$\Delta \Delta C_{T \text{ PC-VF}} = \Delta C_{T \text{ COS}} - \Delta C_{T \text{ PC-VF}}$$

$$\Delta \Delta C_{T \text{ NC-VF}} = \Delta C_{T \text{ COS}} - \Delta C_{T \text{ NC-VF}}$$

**6. Calculer la zone grise, ou zone d'incertitude, située autour de COS-VF d'après la formule ci-dessous.**

**Remarque :** la zone grise (gray zone - GZ) du test a été définie comme l'intervalle de valeurs pour lesquelles les performances du test ne permettent pas une discrimination suffisamment précise. Une valeur située dans la zone grise ne permet pas de révéler la présence ou l'absence du marqueur cible. La zone grise doit être calculée pour chaque expérience. D'après les variations observées au cours des études de précision du test (voir la section « Caractéristiques de performance », page 35), la GZ a été définie à  $\pm 7\%$  de la valeur  $\Delta C_{T \text{ COS}}$ .

Ce procédé de calcul est validé pour toutes les expériences et sur tous les instruments recommandés.

$$\text{GZ : } [(-\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07) ; (+\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07)]$$

## 7. Déterminer le génotype des échantillons inconnus conformément au tableau 13.

Le tableau 14 montre un exemple des calculs et de l'interprétation des résultats obtenus lors d'une expérience représentative.

**Tableau 13. Interprétation des résultats de génotypage**

Résultats	Interprétation
$\Delta\Delta C_{T \text{ Sample}} > + \Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07$	La mutation JAK2 V617F a été détectée.
$\Delta\Delta C_{T \text{ Sample}} < - \Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07$	La mutation JAK2 V617F n'a pas été détectée.
Valeur $\Delta\Delta C_{T \text{ Sample}}$ située dans la GZ $(-\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07 \leq \Delta\Delta C_{T \text{ Sample}} \leq + \Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07)$	Résultat non concluant.

**Tableau 14. Exemple de calculs et d'interprétation des résultats obtenus lors d'une expérience représentative**

Échantillon	C <sub>T</sub> VF	C <sub>T</sub> VF moyenne	C <sub>T</sub> WT	C <sub>T</sub> WT moyenne	ΔC <sub>T</sub>	ΔΔC <sub>T</sub>	Évaluation
PC	27,82	27,74	40,27	40,24	-	12,50	20,12
PC	27,66		40,20				
NC	41,23	41,10	26,66	26,76	14,34	-6,72	Négatif
NC	40,96		26,85				
COS	35,04	34,85	27,28	27,23	7,62	0	IL = 30,53 GZ : -0,53 à +0,53
COS	34,66		27,17				
Echant. 1	42,15	41,63	28,86	28,80	12,83	-5,21	Négatif
Echant. 1	41,10		28,73				
Echant. 2	30,54	30,73	28,99	29,10	1,63	5,99	Positif
Echant. 2	30,92		29,20				
Echant. 3	37,31	37,71	30,11	30,22	7,49	0,13	Non concluant (situé dans la GZ)
Echant. 3	38,11		30,33				
Echant. 4	45	45	39,25	38,85	Ne peut pas être analysé (C <sub>T</sub> VF moyenne > 40 et C <sub>T</sub> WT moyenne > IL)		
Echant. 4	45		38,45				

## Témoins

Le contrôle H<sub>2</sub>O ne doit générer aucune valeur C<sub>T</sub> (ou Cp), que ce soit pour JAK2 V617F ou pour JAK2 WT. Une valeur C<sub>T</sub> (Cp) associée à un contrôle H<sub>2</sub>O peut indiquer une contamination croisée. Voir la section « Guide de résolution des problèmes » ci-dessous.

La mutation JAK2 V617F doit être détectée pour l'échantillon PC-VF.

La mutation JAK2 V617F ne doit pas être détectée pour l'échantillon NC-VF.

Voir la section « Guide de résolution des problèmes », ci-dessous, pour l'interprétation des résultats inappropriés.

# Guide de résolution des problèmes

Ce guide de résolution des principaux problèmes rencontrés peut aider à répondre à certaines questions qui peuvent se poser. Pour plus d'informations, voir aussi la page Foire aux Questions de notre Centre d'assistance technique : [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Les scientifiques des Services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et d'analyses (pour les coordonnées, voir la section « », page 39).

## Commentaires et suggestions

---

### Le signal du témoin positif est négatif

- |  |   |
|--|---|
| a) Erreur de pipetage  | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.<br><br>Répéter l'analyse PCR.  |
| b) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit | Conserver le kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch entre -30 et -15 °C et garder les mélanges sonde et amorces (PPM) à l'abri de la lumière. Voir « Conservation et manipulation des réactifs », page 13.<br><br>Éviter la congélation et la décongélation répétées.<br><br>Aliquoter les réactifs pour les stocker. |

### Les témoins négatifs sont positifs et les témoins positifs sont positifs avec le PPM non approprié

- |                       |  |
|-----------------------|--|
| Contamination croisée | Remplacer tous les réactifs critiques.<br><br>Recommencer l'expérience avec de nouvelles aliquotes de tous les réactifs.<br><br>Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables conformément aux pratiques communément admises pour prévenir les contaminations croisées. |
|-----------------------|--|

## Commentaires et suggestions

---

### Pas de signal, même pour les témoins positifs

- |  |   |
|--|---|
| a) Erreur de pipetage ou réactifs omis   | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.<br>Répéter l'analyse PCR.  |
| b) Effets inhibiteurs du matériel de l'échantillon dus à une purification insuffisante | Recommencer la préparation de l'ADN.  |
| c) LightCycler : le canal de détection choisi est incorrect                            | Définir le canal sur F1/F2 ou 530 nm/640 nm.  |
| d) LightCycler : pas d'acquisition des données programmée                              | Vérifier la programmation des cycles.<br>Sélectionner le mode d'acquisition « Single » (simple) à la fin de chaque phase d'hybridation de la PCR. |

### Signal nul ou de faible intensité avec les échantillons mais témoins positifs OK

- |   |   |
|---|---|
| Qualité insuffisante ou faible concentration de l'ADN | Toujours vérifier la qualité et la concentration de l'ADN avant de commencer. |
|---|---|

### LightCycler : L'intensité de fluorescence est trop faible

- |  |   |
|--|---|
| a) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit | Conserver le kit <i>ipsogen JAK2 MutaSearch</i> entre -30 et -15 °C et garder les mélanges sonde et amorces (PPM) à l'abri de la lumière. Voir « Conservation et manipulation des réactifs », page 13.<br>Éviter la congélation et la décongélation répétées.<br>Aliquoter les réactifs pour les stocker. |
| b) Quantité initiale très faible d'ADN cible                       | Augmenter la quantité d'échantillon d'ADN.<br><b>Remarque</b> : selon la méthode de préparation de l'ADN choisie, des effets inhibiteurs peuvent survenir   |

## Commentaires et suggestions

---

### LightCycler : l'intensité de fluorescence varie

- |  |  |
|--|--|
| a) Erreur de pipetage  | La variabilité, liée à ce que l'on appelle des « erreurs de pipetage », peut être réduite en analysant les données en mode F1/F2 ou 530 nm/640 nm.   |
| b) Centrifugation insuffisante des capillaires                 | <p>Le mélange de PCR préparé se trouve peut-être toujours dans le vaisseau supérieur du capillaire ou une bulle d'air est coincée à l'extrémité du capillaire.</p> <p>Toujours centrifuger les capillaires chargés avec le mélange de réaction tel que décrit dans le guide de fonctionnement de l'appareil.</p> |
| c) La surface extérieure de l'extrémité du capillaire est sale | Toujours porter des gants durant la manipulation des capillaires.  |

## Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de kit *ipsogen* JAK2 MutaSearch est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit. Les certificats d'analyse sont disponibles sur demande à l'adresse suivante :

**[www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/)**.

## Limites

Tous les réactifs ne peuvent être utilisés que dans le cadre de diagnostics *in vitro*.

L'utilisation de ce produit est réservée à un personnel spécialement formé aux procédures de diagnostic *in vitro*.

Il faut se conformer strictement au manuel d'utilisation pour obtenir des résultats de PCR optimaux.

Il convient de porter une attention particulière aux dates limite d'utilisation imprimées sur la boîte et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants ayant expiré.

Tous les résultats diagnostiques générés doivent être interprétés par rapport à d'autres résultats cliniques ou de laboratoire. Il incombe aux utilisateurs de valider la performance du système pour toutes les procédures dans leur laboratoire non couvertes par les études de performance QIAGEN.

# Caractéristiques de performance

## Études non cliniques

Des études non cliniques ont été conduites afin de déterminer les performances analytiques du kit *ipsogen* JAK2 MutaSearch.

### Précision autour de la limite Cut-off

Trois échantillons indépendants correspondant à de faibles taux de mutation ont été mesurés 38 fois à l'aide de 3 lots de kit *ipsogen* JAK2 MutaSearch sur un appareil Applied Biosystems 7500. Les résultats de cette étude sont résumés dans les tableaux 15 et 16.

**Table 15. Valeurs  $\Delta C_T$  et données de précision obtenues lors des études non cliniques**

Échantillon (% d'allèle V617F)	$\Delta C_T$ [minimum ; maximum]	Coefficient de variation (%)
0,5 %	[7,8 ; 10,9]	7,2 %
1 %	[6,7 ; 8,8]	5,6 %
2 %	[5,9 ; 7,7]	5,5 %
COS-VF	[6,9 ; 8,8]	6,2 %

**Table 16. Résultats de génotypage, d'après le calcul de la valeur  $\Delta\Delta C_T$ , obtenus lors des études non cliniques**

Échantillon (% d'allèle V617F)	Replicats	Mutation détectée	Résultat non concluant	Mutation non détectée
0,5 %	38	0	3	35
1 %	38	3	27	4
2 %	38	33	5	0

Pour 92 % des échantillons à 0,5 % de JAK2 V617F, la mutation n'a pas été détectée.

Pour 87 % des échantillons à 2 % de JAK2 V617F, la mutation a été détectée.

## Limites de charge

La charge d'ADN génomique recommandée est de 25 ng. Différentes charges d'ADN ont été testées afin de déterminer si la quantité d'ADN utilisée a une incidence sur les résultats d'interprétation des échantillons. Le tableau 17 résume les résultats obtenus.

**Tableau 17. Incidence de la charge d'ADN génomique**

Échantillon (% d'allèle V617F)	Charge (ng)	Replicats	Mutation détectée	Résultat non concluant	Mutation non détectée
<1 %	2,5	6	Échantillons non analysés (valeurs > IL)		
	10	6	0	1	5
	25	6	0	0	6
	100	6	0	0	6
	250	6	0	0	6
<b>Total &lt;1 %</b>		<b>30</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>23</b>
1 %	2,5	3	Échantillons non analysés (valeurs > IL)		
	10	3	0	1	2
	25	3	0	2	1
	100	3	0	3	0
	250	3	0	2	1
<b>Total 1 %</b>		<b>15</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>4</b>
2 %, 4 %, 50 %, 78 % ou 100 %	2,5	15	15	0	0
	10	15	15	0	0
	25	15	15	0	0
	100	15	15	0	0
	250	15	15	0	0
<b>Total</b>		<b>75</b>	<b>75</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

L'analyse d'échantillons dilués ou fortement concentrés (c'est-à-dire  $< 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  d'ADN ou  $> 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  d'ADN, respectivement) a permis d'établir que de telles concentrations peuvent avoir une incidence sur les valeurs  $\Delta\Delta C_T$  (ou  $\Delta\Delta C_p$ ). Elles ne peuvent pas produire de résultats faux positifs ou faux négatifs mais risquent de donner des résultats non concluants pour les échantillons à très faible pourcentage de JAK2 V617F.

## Études cliniques

Des échantillons d'ADN (extrait de sang périphérique ou de moelle osseuse) prélevés sur 81 sujets chez lesquels un néoplasme myéloprolifératif était suspecté, et préalablement caractérisés à l'aide du kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ (QIAGEN, réf. 673223), ont été analysés avec 9 échantillons d'ADN de donneurs sains avec le kit *ipsogen* JAK2 MutaSearch, sur un appareil Applied Biosystems 7500. Le tableau 18 résume les résultats obtenus.

**Tableau 18. Résultats obtenus sur les échantillons analysés à l'aide des kits *ipsogen* JAK2 MutaSearch et *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ**

		Kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ		
		Mutation détectée	Non concluant	Mutation non détectée
Kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch	Mutation détectée	37	1	1
	Non concluant	0	0	1
	Mutation non détectée	0	0	50

La concordance globale s'est avérée égale à 98,9 % (intervalle de confiance à 95 % : 93,8–99,8 %).

La concordance positive s'est avérée égale à 100,0 % (intervalle de confiance à 95 % : 90,6–100 %).

La concordance négative s'est avérée égale à 98,0 % (intervalle de confiance à 95 % : 89,7–99,7 %).

## Bibliographie

1. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144.
2. Levine, R.L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387.
3. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 352, 1779.
4. Baxter, E.J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 36, 1054.
5. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
6. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
7. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* **22**, 14.
8. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
9. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.

## Symboles

Les symboles suivants peuvent figurer sur l’emballage et les étiquettes :

	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Matériel médical destiné au diagnostic <i>in vitro</i>
	Référence du catalogue
	Numéro de lot
	Référence du matériel
	Code article international (GTIN)
	Limite de température
	Fabricant
	Lire le mode d’emploi

## Coordonnées

Pour une assistance technique et plus d’informations, consulter notre Centre d’assistance technique à [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), appeler le 00800-22-44-6000 ou contacter l’un des Départements du service technique de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Pour commander

Produit	Contenu	Référence
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit (24)	Pour 24 réactions : témoin positif V617F, témoin négatif V617F, échantillon Cut-Off V617F, mélange de sonde et amorces JAK2 et JAK2 V617F	673823
<p><b>Rotor-Gene Q MDx — Pour analyse PCR en temps réel validée pour le diagnostic <i>in vitro</i> dans le cadre d'applications cliniques</b></p>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cycleur thermique en temps réel et analyseur de fonte de haute résolution avec 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) et canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre ; installation et formation non comprises	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cycleur thermique en temps réel et analyseur de fonte de haute résolution avec 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) et canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre ; installation et formation comprises	9002033
<p><b>Kit QIAamp® DNA Blood Maxi — Pour la purification de l'ADN génomique du sang</b></p>		
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (10)	Pour 10 maxi-préparations d'ADN : 10 colonnes QIAamp Maxi Spin, protéase QIAGEN, tampons, tubes de prélèvement (50 ml)	51192
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (50)	Pour 50 maxi-préparations d'ADN : 50 colonnes QIAamp Maxi Spin, protéase QIAGEN, tampons, tubes de prélèvement (50 ml)	51194

Pour obtenir les dernières informations sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN respectif. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou peuvent être sollicités auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Ce produit est destiné à être utilisé dans le cadre de diagnostics *in vitro*. Les produits *ipsogen* ne peuvent être revendus, modifiés pour la revente, ou utilisés pour fabriquer d'autres produits commerciaux sans l'autorisation écrite de QIAGEN.

Les informations contenues dans ce document peuvent être modifiées sans préavis. QIAGEN n'assume aucune responsabilité quant aux erreurs qui pourraient apparaître dans ce document. Ce document est considéré comme complet et exact au moment de sa publication. QIAGEN ne pourra en aucun cas être tenue responsable de dommages accessoires, particuliers, multiples ou consécutifs en relation avec, ou découlant de, l'utilisation de ce document.

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

La mutation JAK2 V617F et ses applications sont protégées par des brevets, notamment le brevet européen EP1692281, les brevets US 7,429,456 et 7,781,199, ainsi que les demandes de brevet US20090162849 et US20120066776 et leurs contreparties étrangères.

L'achat de ce produit ne confère aucun droit pour son utilisation dans le cadre d'essais cliniques pour des thérapies ciblant ou utilisant JAK2 V617F. QIAGEN développe des programmes de licences spécifiques pour ce type d'utilisation. Veuillez contacter notre département Licences et Propriété Intellectuelle à l'adresse suivante : [jak2licenses@qiagen.com](mailto:jak2licenses@qiagen.com).

Marques de commerce : QIAGEN<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, *ipsogen*<sup>®</sup>, MutaSearch<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup> (Groupe QIAGEN) ; ABI PRISM<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>®</sup>, FAM<sup>™</sup>, SYBR<sup>®</sup>, TAMRA<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc.); HybProbe<sup>®</sup>, LightCycler<sup>®</sup>, TaqMan<sup>®</sup> (Groupe Roche).

#### **Accord de licence limitée**

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

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

Pour les termes de licence mis à jour, voir [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1354-004 © 2013–2016 QIAGEN, tous droits réservés.



---

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

