

Setembro de 2017

Manual do kit *ipsogen*[®] JAK2 RGQ PCR



Para utilização com o equipamento Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

Versão 1

Diagnóstico in vitro quantitativo



673623



1107956



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA



1107956PT

Conteúdo

Utilização prevista.....	4
Resumo e explicação	4
Princípio do procedimento.....	6
Materiais fornecidos	9
Conteúdo do kit	9
Materiais necessários mas não fornecidos.....	10
Advertências e precauções	12
Precauções gerais	12
Armazenamento e manuseamento de reagentes.....	15
Condições de transporte	15
Condições de armazenagem.....	15
Estabilidade	15
Armazenamento e manuseamento de amostras.....	16
Procedimento	16
Extracção e preparação de ADN genómico a partir de sangue total.....	16
Qualificação e quantificação de ADN.....	24
Normalização de amostras de ADN genómico	24
Protocolo: qPCR em equipamento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.....	25
Interpretação de resultados.....	34
Guia de resolução de problemas	39
Controlo de qualidade	41
Limitações.....	41
Características de desempenho.....	42
Limite do branco	42
Limite de detecção	42
Linearidade	43
Repetibilidade e reprodutibilidade	43
Substâncias interferentes	44
Validação clínica e comparação de métodos	44

Bibliografia	46
Símbolos	47
Informações de contacto	48
Informações para encomendar	49

Utilização prevista

O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR é um teste quantitativo *in vitro* destinado à detecção do alelo JAK2 V617F/G1849T em ADN genómico extraído de sangue total. O teste deverá ser uma ajuda no diagnóstico de neoplasia mieloproliferativa (MPN), juntamente com outros factores clínico-patológicos.

Resumo e explicação

Uma mutação somática recorrente, V617F, que afecta o gene tirosina quinase Janus 2 (JAK2), foi identificada em 2005 (1–4), levando a uma descoberta muito importante para a compreensão, classificação e diagnóstico de MPN. JAK2 é uma molécula de sinalização intracelular essencial para várias citocinas, incluindo a eritropoietina.

A mutação JAK2 V617F é detectada em > 95% dos doentes com policitemia vera (PV), 50 a 60% dos doentes com trombocitopenia essencial (ET), e em 50% dos doentes com mielofibrose primária (PMF). JAK2 V617F também foi detectada em alguns casos raros de leucemia mielomonocítica crónica, síndrome mielodisplásica (MDS), mastocitose sistémica, e leucemia neutrofílica crónica, mas em 0% de casos de leucemia mielóide crónica (CML) (5).

A mutação corresponde a uma única alteração no nucleótido do nucleótido 1849 de JAK2 no exão 14, causando uma substituição única de valina (V) por fenilalanina (F) na posição 617 da proteína (domínio JH2). A mutação resulta na activação constitutiva de JAK2, na transformação hematopoiética *in vitro* e no crescimento de colónias de eritróides independentes da eritropoietina (EEC) em todos os doentes com policitemia vera e numa grande proporção de doentes com trombocitopenia essencial e PMF (6). JAK2 V617F representa um factor essencial na transformação de células hematopoiéticas em MPN, mas os mecanismos patológicos exactos, com a mesma mutação única, que resulta nas tais entidades clínicas e biológicas diferentes ainda não estão completamente esclarecidos.

Normalmente, o diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas baseou-se em critérios clínicos, de histologia de medula óssea e citogenéticos. A descoberta de um marcador molecular específico da doença resultou na simplificação do processo e numa maior exactidão do diagnóstico. A detecção da mutação JAK2 V617F faz agora parte dos critérios de referência de 2008 da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico de MPN BCR-ABL negativa (Tabela 1), e a presença desta mutação é um critério muito importante para a confirmação do diagnóstico.

Tabela 1. Critérios da OMS para o diagnóstico de MPN (adaptado a partir da referência 7)

Critérios para um diagnóstico de PV	
Muito importantes	<p>1. Hemoglobina > 18,5 g.dl⁻¹ (homens) ou > 16,5 g.dl⁻¹ (mulheres) ou hemoglobina ou hematócrito > 99º percentil do intervalo de referência para idade, sexo ou altitude de residência ou</p> <p>Hemoglobina > 17 g.dl⁻¹ (homens) ou > 15 g.dl⁻¹ (mulheres) se estiver associada a um aumento contínuo de ≥ 2 g.dl⁻¹ de linha de base que não possa ser atribuído à correcção de carência de ferro ou</p> <p>Volume elevado de glóbulos vermelhos > 25% acima do valor médio normal previsto</p> <p>2. Presença de JAK2V617F ou mutação semelhante</p>
Pouco importantes	<p>1. Mieloproliferação das 3 linhagens na medula óssea</p> <p>2. Nível de eritropoietina de soro abaixo do normal</p> <p>3. Aumento de EEC</p>
Critérios para um diagnóstico de trombocitopenia essencial	
Muito importantes	<p>1. Contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$</p> <p>2. Proliferação de megacariócitos com uma morfologia grande e madura. Ausência ou pouca quantidade de granulócitos ou proliferação de eritróides</p> <p>3. Não cumprir os critérios da OMS para LMC, PV, PMF, SMD, ou outra neoplasia mielóide</p> <p>4. Manifestação de JAK2V617F ou de outro marcador clonal ou</p> <p>a não evidência de trombocitose reactiva</p>
Pouco importantes	–
Critérios para um diagnóstico de PMF	
Muito importantes	<p>1. Proliferação de megacariócitos e atipia, acompanhadas por fibrose de colagénio e/ou reticular ou</p> <p>Em caso de ausência de fibrose reticular, as alterações de megacariócitos devem ser acompanhadas pelo aumento da celularidade da medula, proliferação granulocítica e frequentemente diminuição de eritropoiese (por exemplo, PMF pré-fibrótica)</p> <p>2. Não cumprir os critérios da OMS para LMC, PV, SMD, ou outra neoplasia mielóide</p> <p>3. Manifestação de JAK2V617F ou de outro marcador clonal ou</p> <p>a não evidência de fibrose medular reactiva</p>
Pouco importantes	<p>1. Leucoeritroblastose</p> <p>2. Aumento de desidrogenase láctica no soro</p> <p>3. Anemia</p> <p>4. Esplenomegalia palpável</p>

CML: leucemia mielóide crónica; EEC: colónia de eritróides endógena; trombocitopenia essencial: trombocitopenia essencial; hemoglobina: hemoglobina; SMD: síndrome mielodisplásica; PMF: mielofibrose primária; PV: policitemia vera; OMS: Organização Mundial de Saúde.

Desde 2006, estão disponíveis vários métodos baseados essencialmente em técnicas de PCR ou sequenciação, tais como testes desenvolvidos em laboratório para detectar a presença, e possivelmente a quantidade de JAK2V617F. Estes testes têm um desempenho analítico diferente, principalmente no que se refere à precisão e nível de sensibilidade. Esta diferença pode ter influência na necessidade de efectuar análises de medula óssea, no tempo necessário para estabelecer um diagnóstico final e possivelmente no desempenho do diagnóstico.

Princípio do procedimento

Têm sido propostas várias técnicas diferentes para determinar quantitativamente a proporção de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) em amostras de ADN. Algumas, tais como as curvas de fusão e a sequenciação, são apenas semi-quantitativas. Os métodos baseados na reacção quantitativa em tempo real de polimerização em cadeia (qPCR) são preferidos, devido à sua maior sensibilidade. A utilização de um primer específico de SNP permite a amplificação selectiva de um alelo mutante (MT) ou de tipo selvagem (WT), que é facilmente detectável mediante a utilização de um equipamento de qPCR em tempo real. Isto permite uma sensibilidade <0,1%, que está em linha com o cut-off de JAK2 de 1% aceite actualmente, que é utilizado para a positividade clínica. Contudo, deve ser tido em conta que alguns peritos clínicos consideram a presença de qualquer carga de JAK2 como sendo significativa clinicamente no momento do diagnóstico e, por esse motivo, é necessário um método sensível como qPCR (8). O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR é baseado nessa técnica.

A utilização de qPCR permite a quantificação precisa de produtos PCR durante a fase exponencial do processo de amplificação de PCR. Os dados quantitativos da PCR podem ser rapidamente obtidos sem processamento pós-PCR, através da detecção em tempo real de sinais fluorescentes durante e/ou posteriores ao ciclo da PCR, reduzindo assim drasticamente o risco de contaminação de produtos PCR. Actualmente estão disponíveis 3 tipos principais de técnicas de qPCR: análise de qPCR, utilizando corante SYBR® Green I, análise de qPCR utilizando sondas de hidrólise e análise de qPCR utilizando sondas de hibridação.

Este ensaio explora o princípio de hidrólise de oligonucleótido de qPCR. Durante a PCR, os primers directos e inversos hibridizam-se para uma sequência específica. Está contido na mesma mistura outro oligonucleótido ligado ao corante. Esta sonda, que consiste num oligonucleótido etiquetado com um corante repórter 5' e um corante de extinção sem corante 3' a jusante, hibridiza-se para uma sequência alvo dentro do produto de PCR. A análise de qPCR com sondas de hidrólise explora a actividade exonuclease 5'→3' da polimerase de ADN de *Thermus aquaticus* (*Taq*). Quanto a sonda está intacta, a proximidade do corante repórter ao corante de extinção resulta na supressão da fluorescência do repórter, principalmente por transferência de energia de tipo Förster.

Durante a PCR, se estiver presente o alvo de interesse, os primers directo e inverso hibridizam-se especificamente e flanqueiam a sonda. A actividade exonuclease 5'→3' da ADN polimerase faz a clivagem da sonda entre o corante repórter e o de extinção apenas se os três oligonucleótidos se hibridizarem para o alvo. Os fragmentos da sonda são, depois, deslocados do alvo e a polimerização da cadeia continua. O final 3' da sonda é bloqueado para evitar a extensão da

sonda durante a PCR (Figura 1). O processo ocorre em cada ciclo e não interfere com a acumulação exponencial de produto.

O aumento do sinal de fluorescência é detectado apenas se a sequência alvo for complementar aos primers e à sonda e, por conseguinte, for amplificada durante a PCR. Devido a estes requisitos, a amplificação não específica não é detectada. Assim, o aumento na fluorescência é directamente proporcional à amplificação do alvo durante a PCR.

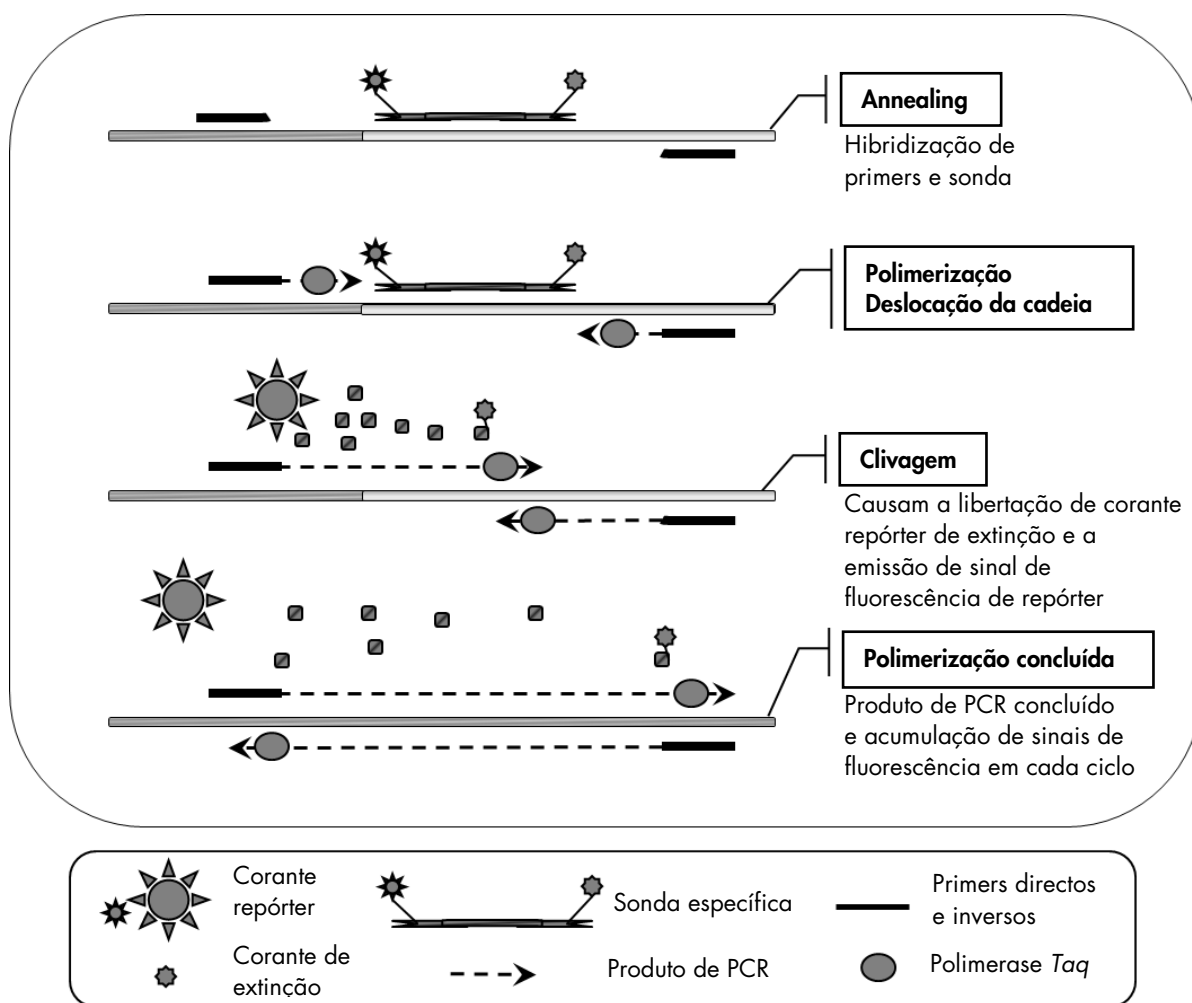


Figura 1. Princípio da reacção. A tecnologia de PCR quantitativa específica de alelo usada neste kit de ensaio permite a detecção de SNPs sensível, exacta e altamente reprodutível. Esta técnica baseia-se na utilização de primers inversos específicos para os alelos de tipo selvagem e V617F (8). Somente uma correspondência perfeita entre o primer e o ADN alvo permite a extensão e a amplificação na PCR (ver Figura 2).

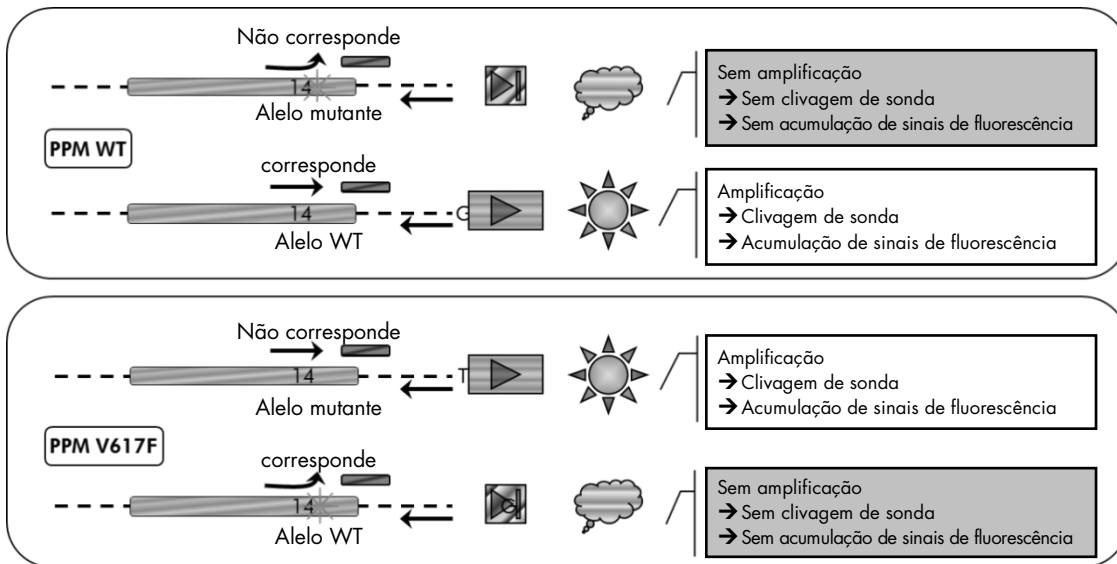


Figura 2. PCR específica de alelo. A utilização de primers de tipo selvagem ou V617F e a mistura de sondas permite a detecção específica do alelo de tipo selvagem ou alelo com mutação em duas reacções separadas efectuadas utilizando a mesma amostra. Os resultados podem ser expressos como uma percentagem das cópias VF entre o total de cópias JAK2.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit (24)		
Ref.º		673623
Número de reacções		24
JAK2 Mutant Control (controlo mutante de JAK2) (100% alelo V617F)	Vermelho	33 µl
JAK2 WT Control (controlo de JAK2 WT) (100% alelo de tipo selvagem)	Verde	33 µl
JAK2 MT Quant Standard 1 (padrão quant. de JAK2 MT 1) (5 x 10 ¹ cópias/5 µl V617F)	Vermelho	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 2 (padrão quant. de JAK2 MT 2) (5 x 10 ² cópias/5 µl V617F)	Vermelho	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 3 (padrão quant. de JAK2 MT 3) (5 x 10 ³ cópias/5 µl V617F)	Vermelho	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 4 (padrão quant. de JAK2 MT 4) (5 x 10 ⁴ cópias/5 µl V617F)	Vermelho	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 1 (padrão quant. de JAK2 WT 1) (5 x 10 ¹ cópias de tipo selvagem/5 µl)	Verde	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 2 (padrão quant. de JAK2 WT 2) (5 x 10 ² cópias de tipo selvagem/5 µl)	Verde	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 3 (padrão quant. de JAK2 WT 3) (5 x 10 ³ cópias de tipo selvagem/5 µl)	Verde	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 4 (padrão quant. de JAK2 WT 4) (5 x 10 ⁴ cópias de tipo selvagem/5 µl)	Verde	20 µl
JAK2 MT Reaction Mix (mistura da reacção de JAK2 MT)*	Vermelho	1010 µl
JAK2 WT Reaction Mix (mistura da reacção de JAK2 WT)†	Verde	1010 µl
Taq DNA polymerase (polimerase Taq de ADN) (HotStarTaq® 5 unidades/µl)	Verde-menta	85 µl
TE buffer for sample dilution (tampão TE para diluição de amostra)	Branco	1,9 ml
Water for no template control (NTC) (água para controlo sem modelo (NTC))	Branco	1,9 ml
ipsogen® JAK2 RGQ PCR Kit Handbook (manual em inglês)		1

* Mistura de PCR contendo todos os componentes necessários, excepto polimerase Taq de ADN e ADN alvo para o alelo MT.

† Mistura de PCR contendo todos os componentes necessários, excepto polimerase Taq de ADN e ADN alvo para o alelo WT.

Materiais necessários mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (SDS) apropriadas, disponíveis no fornecedor do produto.

Consumíveis e reagentes para extracção manual de ADN

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (ref.º 61104)
- Etanol (96 a 100%)

Nota: não utilizar álcool desnaturado, pois este contém outras substâncias como o metanol ou a butanona.

Consumíveis e reagentes para extracção automatizada de ADN

- QIAasymphony® DSP DNA Mini Kit (ref.º 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (cartuchos de preparação de amostras, 8 poços) (ref.º 997002)
- 8-Rod Covers (tampas de 8 hastes) (ref.º 997004)
- Filter-Tips, 1.500 µl (pontas com filtros) (ref.º 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (pontas com filtros) (ref.º 990332)
- Elution Microtubes CL (micro tubos de eluição CL) (ref.º 19588)
- Tip disposal bags (sacos de eliminação de pontas) (ref.º 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (micro tubos de 2,0 ml tipo H) (Sarstedt®, ref.º 72.694, www.sarstedt.com)

Consumíveis e reagentes para PCR

- Pontas de pipetas de PCR, estéreis, isentas de nuclease e resistentes a aerossóis, com filtros hidrófobos
- Tubos de PCR de 1,5 ml ou 2,0 ml isentos de nuclease
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (tubos e tampas de tiras, de 0,1 ml) para Rotor-Gene Q (ref.º 981103 ou 981106)
- Gelo

Equipamento

- Micropipetador (adaptável)* dedicado a PCR (1 a 10 µl; 10 a 100 µl; 100 a 1000 µl)
- Luvas descartáveis
- Agitador de vórtex
- Bloco de aquecimento para lise de amostras a 56 °C
- Centrífuga de bancada* com rotor de tubos de reacção de 0,5 ml/1,5/2,0 ml (capaz de atingir 13 000 a 14 000 rpm)
- Espectrofotómetro

Equipamento para preparação automatizada de amostras

- Equipamento QIASymphony SP (ref.º 9001297), versão de software 4.0 ou superior, acessórios fornecidos e protocolo **Blood_200_V7_DSP**
- Tube Insert 3B (inserto de tubo 3B, transportador de amostra (samplecarr.) de 2,0 ml v2, com inserto (24), Qsym, ref.º 9242083)

Equipamento para PCR

- Equipamento de PCR em tempo real†: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM e acessórios fornecidos
- Rotor-Gene AssayManager® software v2.1.x (x ≥ 0) instalado
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in v1.0.x (x ≥ 0) instalado
- Perfil de ensaios JAK2 CE (ipsogen_JAK2_blood_CE_V1_0_x (x ≥ 0)) importado

* Certifique-se de que os equipamentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Advertências e precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (SDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online no formato compacto e prático PDF em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as SDS de cada kit QIAGEN® e componente do kit.

ATENÇÃO



ATENÇÃO: NÃO adicione lixívia nem soluções ácidas directamente nos desperdícios de preparações da amostra.

Precauções gerais

A utilização de testes de qPCR exige boas práticas laboratoriais que incluem a manutenção do equipamento, que são dedicadas a biologia molecular e que estão em conformidade com os regulamentos aplicáveis e as normas relevantes.

Este kit destina-se a ser utilizado em diagnóstico *in vitro*. Os reagentes e as instruções fornecidos neste kit foram validados para um desempenho ideal.

- O teste deve ser utilizado com amostras de sangue total anticoaguladas com EDTA de potássio e armazenadas a uma temperatura de 2 °C a 8 °C, durante um tempo máximo de 96 horas, até à extracção de ADN.
- Todos os produtos químicos e materiais biológicos são potencialmente perigosos. As amostras são potencialmente infecciosas e devem ser tratadas como materiais de risco biológico.
- Elimine as amostras e os desperdícios dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.
- Os reagentes para o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR estão diluídos numa concentração optimizada. Não efectue diluição adicional dos reagentes, pois poderia causar a diminuição do seu desempenho.
- Não utilize volumes de reacção (mistura de reacção mais amostra) inferiores a 25 µl.

- Todos os reagentes fornecidos no kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR devem ser utilizados apenas com os outros reagentes fornecidos no mesmo kit. Não substitua um reagente de um kit pelo mesmo reagente de outro kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR, mesmo que pertença ao mesmo lote, pois isso pode afectar o desempenho.
- Para advertências, precauções e procedimentos adicionais, consulte o manual do utilizador do equipamento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM e o manual do utilizador do RGAM 2.1.
- A alteração dos tempos e temperaturas de incubação pode dar origem a dados erróneos ou discordantes.
- Não utilize componentes fora de prazo de validade ou armazenados de forma incorrecta.
- As misturas de reacção podem ser alterados se forem expostas à luz.
- Tenha um cuidado extremo para evitar a contaminação das misturas pelos materiais sintéticos contidos nos reagentes de padrão quant. JAK2 MT e JAK2 WT, e pelos reagentes de controlo mutante de JAK2 e JAK2 WT.
- Tenha um cuidado extremo para evitar a contaminação por transporte dos produtos de ADN ou PCR, que causaria um sinal falso positivo.
- Tenha um cuidado extremo para evitar a contaminação por DNase, que poderia causar a degradação do ADN do modelo.
- Utilize pipetas individuais, de uso exclusivo, para preparar as misturas de reacção e adicionar modelos.
- Não abra o equipamento Rotor-Gene Q MDx até que a execução esteja concluída.
- Não abra os tubos do Rotor-Gene Q depois de a execução estar concluída.
- É necessário ter cuidado para garantir testes de amostras correctos, com ênfase na entrada de amostra errónea, erro de carregamento e erro de pipetagem.
- Certifique-se de que as amostras são manuseadas de uma forma sistemática, para assegurar a identificação correcta a qualquer momento, mantendo assim a rastreabilidade.

Portanto, recomendamos o seguinte:

- Utilizar material de laboratório (por ex., pipetas, pontas de pipetas, frascos-ampola de reacção) isento de nuclease e usar luvas durante a realização do ensaio.
- Utilizar pontas de pipetas novas e resistentes a aerossóis em todas as fases de pipetagem para evitar a contaminação cruzada das amostras e reagentes.
- Preparar a mistura principal de pré-PCR com material dedicado (pipetas, pontas, etc.) numa área dedicada onde não sejam introduzidas matrizes de ADN (produtos de PCR, plasmídeo ou ADN). Adicionar o modelo numa zona separada (preferencialmente numa sala em separado) com material específico (pipetas, pontas, etc.).

Para obter informações sobre a segurança relativamente aos kits de extracção QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (ref.º 61104) e QIAasymphony DNA DSP Mini Kit (ref.º 937236), consulte os respectivos manuais.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Condições de transporte

O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR é expedido em gelo seco. Se qualquer componente do kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR (excepto a enzima) não chegar ao destino em estado congelado, se a embalagem exterior tiver sido aberta durante o transporte, ou se a remessa não contiver uma nota de embalagem, o manual de instruções ou os reagentes, contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica QIAGEN ou os distribuidores locais (consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Condições de armazenagem

O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR deve ser armazenado, logo após ter sido recebido, a uma temperatura de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ após a recepção, num congelador de temperatura constante e protegido da luz.

Para obter informações relativas ao armazenamento dos kits de extracção QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (ref.º 61104) e QIASymphony DNA DSP Mini Kit (ref.º 937236), consulte os respectivos manuais.

Estabilidade

Quando armazenado sob as condições de armazenagem especificadas, o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR permanece estável até à data do prazo de validade indicada na etiqueta da caixa.

Uma vez abertos, os reagentes podem ser armazenados nas respectivas embalagens originais entre -30 e $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à data do prazo de validade indicada, visível na etiqueta da caixa. Deve evitar-se o descongelamento e congelamento sucessivos. Não exceda um máximo de 5 ciclos de congelamento/descongelamento.

Para obter informações sobre a estabilidade relativamente aos kits de extracção QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (ref.º 61104) e QIASymphony DNA DSP Mini Kit (ref.º 937236), consultar os respectivos manuais.

- Misture com cuidado, invertendo o tubo 10 vezes, e centrifugue todos os tubos excepto o da enzima antes da abertura.

- Os prazos de validade de cada reagente estão indicados nas etiquetas dos componentes individuais. Sob as condições correctas de armazenamento, o produto irá manter o desempenho para o tempo de estabilidade, desde que sejam utilizados os mesmos lotes de componentes.
- Os procedimentos de controlo de qualidade da QIAGEN utilizam testes funcionais de libertação de kits para cada lote individual de kits. Por isso, não misture reagentes de kits diferentes, mesmo que pertençam ao mesmo lote.

Armazenamento e manuseamento de amostras

Amostras de sangue total

O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR deve ser utilizado com amostras de ADN genómico extraído de amostras de sangue total anticoaguladas com EDTA de potássio armazenado do seguinte modo:

- a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C durante um máximo de 96 horas;
- a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C durante um máximo de 96 horas; ou
- congelado a uma temperatura entre -15 °C e -30 °C durante um máximo de 1 mês.

Nota: as amostras de sangue total devem ser expedidas sob as mesmas condições em que estavam armazenadas, para evitar alterações de temperatura durante o armazenamento e a remessa.

Amostras de ADN genómico

Assim que o ADN genómico for extraído, as amostras podem ser armazenadas e expedidas a uma temperatura de entre -30 °C a -15 °C, durante um tempo máximo de 15 meses, directamente após a respectiva extracção ou após serem diluídas num tampão TE.

Procedimento

Extracção e preparação de ADN genómico a partir de sangue total

O ADN genómico deve ser extraído mediante a utilização de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (ref.º 61104) ou do equipamento QIASymphony SP, juntamente com QIASymphony DSP DNA Mini Kit (ref.º 937236).

Certificar-se de que os reagentes a serem utilizados não expiraram e foram transportados e armazenados sob as condições correctas.

Nota: o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR apenas foi validado em combinação com QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (ref.º 61104) ou QIASymphony DSP DNA Mini Kit (ref.º 937236). Não utilizar qualquer outro produto de extracção de ADN.

Extracção manual de ADN genómico, utilizando QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

A extracção manual de ADN genómico deve ser efectuada com QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (ref.º 61104), de acordo com o Manual do QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (*QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook*) correspondente.

○ que fazer antes de iniciar o procedimento

- **Colocar as amostras de sangue à temperatura ambiente (15 a 25 °C) e certificar-se de que estão bem homogeneizadas.**

- **Preparação de Tampão de lise**

Caso se tenha formado um precipitado no Tampão de lise (AL), dissolvê-lo, incubando a 56 °C.

- **Preparação de Protease QIAGEN**

Adicionar 1,2 ml de Solvente de protease (PS) ao frasco de Protease QIAGEN (QP) liofilizada e misturar com cuidado. Para evitar a formação de espuma, misturar, invertendo o frasco várias vezes. Certificar-se de que a Protease QIAGEN (QP) está completamente dissolvida.

Nota: não adicionar QP directamente ao Tampão de lise (AL).

- **Preparação de Tampão de lavagem 1**

Utilizando uma proveta, adicionar 25 ml de etanol (96 a 100%) ao frasco que contém o concentrado de 19 ml de Tampão de lavagem 1 (AW1). Armazenar o Tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído à temperatura ambiente (15 a 25 °C).

Nota: misturar sempre o Tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído, invertendo o frasco várias vezes antes de iniciar o procedimento.

- **Preparação de Tampão de lavagem 2**

Utilizando uma proveta, adicionar 30 ml de etanol (96 a 100%) ao frasco que contém o concentrado de 13 ml de Tampão de lavagem 2 (AW2). Armazenar o Tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído à temperatura ambiente (15 a 25 °C).

Nota: misturar sempre o Tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído, invertendo o frasco várias vezes antes de iniciar o procedimento.

Preparação do Tampão de eluição

É fornecido um frasco de Tampão de eluição (AE) com o kit. Para evitar a contaminação de Tampão de eluição (AE), recomendamos vivamente a utilização de pontas de pipeta com barreira para aerossóis ao pipetar o Tampão de eluição (AE) a partir do frasco e substituir a tampa do frasco logo a seguir.

Colocar o Tampão de eluição (AE) à temperatura ambiente (15 a 25 °C).

- Colocar um bloco de aquecimento a 56°C, para a respectiva utilização no passo 4.

Procedimento

1. Pipetar 20 µl de Protease QIAGEN (QP) para um tubo de lise (LT).

Nota: verificar a data de validade da protease reconstituída antes da respectiva utilização.

2. Adicionar 200 µl de amostra sanguínea ao tubo de lise (LT).

3. Adicionar 200 µl de Tampão de lise (AL) ao tubo de lise (LT), fechar a tampa e misturar, agitando em vórtex durante 15 segundos.

Nota: para assegurar uma lise eficiente, é essencial que a amostra e o Tampão de lise (AL) estejam bem misturados, para que seja produzida uma solução homogénea.

Nota: tendo em conta que o Tampão de lise (AL) tem uma elevada viscosidade, certificar-se de que adiciona o volume correcto de Tampão de lise (AL), pipetando com cuidado ou utilizando uma pipeta adequada.



Não adicionar Protease QIAGEN (QP) directamente ao Tampão de lise (AL).

4. Incubar a uma temperatura de 56 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 10 minutos (± 1 minuto).
5. Centrifugar o tubo de lise (LT) durante cerca de 5 segundos a toda a velocidade para remover pingos do interior da tampa.
6. Adicionar 200 µl de etanol (96 a 100%) ao tubo de lise (LT), fechar a tampa e misturar bem, agitando em vórtex durante ≥ 15 segundos.
7. Centrifugar o tubo de lise (LT) durante ≥ 5 segundos a toda a velocidade, para remover quaisquer pingos de líquido que estejam no interior da tampa.
8. Aplicar com cuidado todo o lisado do passo 7 à mini coluna de rotação QIAamp sem molhar a borda. Evitar tocar com a ponta de pipeta na membrana da mini coluna de rotação QIAamp.

Nota: se estiver a processar várias amostras, abrir apenas um tubo de lise (LT) de cada vez.


9. Fechar a tampa da mini coluna de rotação QIAamp e centrifugar a aproximadamente 6000 x g durante 1 minuto. Colocar a mini coluna de rotação QIAamp num tubo de lavagem limpo (WT) e eliminar o tubo que contém o filtrado.

Nota: se o lisado não tiver passado completamente pela membrana após a centrifugação a 6000 x g (8000 rpm), centrifugar novamente a toda a velocidade (até 20 800 x g) durante 1 minuto.

Nota: se o lisado ainda não passar pela membrana durante a centrifugação, eliminar a amostra e repetir o isolamento e a purificação com novo material de amostras.

10. Abrir com cuidado a mini coluna de rotação QIAamp e adicionar 500 µl de Tampão de lavagem 1 (AW1) sem molhar a borda. Evitar tocar com a ponta de pipeta na membrana da mini coluna de rotação QIAamp.
11. Fechar a tampa da mini coluna de rotação QIAamp e centrifugar a aproximadamente 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Colocar a mini coluna de rotação QIAamp num tubo de lavagem limpo (WT) e eliminar o tubo que contém o filtrado.
12. Abrir com cuidado a mini coluna de rotação QIAamp e adicionar 500 µl de Tampão de lavagem 2 (AW2) sem molhar a borda. Evitar tocar com a ponta de pipeta na membrana da mini coluna de rotação QIAamp.
13. Fechar a tampa da mini coluna de rotação QIAamp e centrifugar a toda a velocidade (aproximadamente 20 000 x g, ou 14 000 rpm) durante 1 minuto. Colocar a mini coluna de rotação QIAamp num tubo de lavagem limpo (WT) e eliminar o tubo que contém o filtrado.
14. Centrifugar a toda a velocidade (aproximadamente 20 000 x g, ou 14 000 rpm) durante 3 minutos para secar completamente a membrana.
15. Colocar a mini coluna de rotação QIAamp num tubo de eluição limpo (ET) e eliminar o tubo de lavagem (WT) que contém o filtrado. Abrir com cuidado a tampa da mini coluna de rotação QIAamp e aplicar 50 a 200 µl de Tampão de eluição (AE) ao centro da membrana. Fechar a tampa e incubar à temperatura ambiente (15 a 25 °C) durante 1 minuto. Centrifugar a aproximadamente 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto para eluir o ADN.
16. Eliminar os tubos de amostras e as placas utilizados e os desperdícios, de acordo com os regulamentos de segurança locais.

Extracção automatizada de ADN genómico, utilizando QIASymphony DSP DNA Mini Kit

A extracção de ADN genómico automatizada deve ser efectuada com o equipamento QIASymphony, utilizando o módulo Preparação de amostras juntamente com o QIASymphony DSP DNA Mini Kit (ref.º 937236) e seguindo as instruções no Manual do kit QIASymphony DSP DNA (*QIASymphony DSP DNA Kit Handbook*). As funcionalidades do protocolo JAK2 estão destacadas com o sinal  no procedimento abaixo.

Com QIASymphony SP, o QIASymphony DSP DNA Mini Kit permite a purificação de ADN automatizada de sangue total humano (utilizando o protocolo Blood_200_V7_DSP em QIASymphony).

- Não é necessário pré-tratamento
- Os tubos são transferidos directamente para QIASymphony SP
- A purificação do ADN é executada com partículas magnéticas

Aspectos importantes antes do início do procedimento




- O volume de sangue total a ser extraído é de 300 µl.
- É necessário certificar-se de que está familiarizado com a operação em QIASymphony SP. Consultar os manuais do utilizador fornecidos juntamente com o seu equipamento, para ter acesso às instruções de operação.
- A manutenção opcional não é obrigatória para o funcionamento do equipamento, mas é altamente recomendada para reduzir o risco de contaminação.
- Antes de utilizar um cartucho de reagentes pela primeira vez, verificar se os Tampões QSL1 e QSB1 não contêm um precipitado. Se for necessário, remover os depósitos que contêm os Tampões QSL1 e QSB1 do cartucho de reagentes e incubar durante 30 minutos a 37 °C, agitando de vez em quando, para dissolver o precipitado. É necessário certificar-se de que substitui os depósitos nas posições correctas. Se o cartucho de reagentes já estiver furado, é necessário certificar-se de que os depósitos estão selados com tiras de vedante reutilizáveis e incubar todo o cartucho de reagentes durante 30 minutos a 37 °C, agitando de vez em quando em banho-maria.
- Tentar evitar a agitação vigorosa do cartucho de reagentes (RC), caso contrário pode ser produzida espuma, o que poderá causar problemas de detecção do nível do líquido.

○ que fazer antes de iniciar o procedimento

- Antes de iniciar o procedimento, é necessário certificar-se de que as partículas magnéticas estão completamente em nova suspensão. Agitar no vórtex o depósito que contém as partículas magnéticas durante pelo menos 3 minutos antes da primeira utilização.
- É necessário certificar-se de que a tampa de perfuração está colocada no cartucho de reagentes e de que a tampa do depósito de partículas magnéticas foi removida ou, se estiver a utilizar um cartucho de reagentes parcialmente utilizado, certificar-se de que as tiras de vedante reutilizáveis foram removidas.
- Certifique-se de que abre os tubos de enzimas.
- Se as amostras tiverem códigos de barras, colocar as amostras no transportador de tubos, de modo que os códigos de barras fiquem virados para o leitor de códigos de barras, no lado esquerdo do QIASymphony SP.

Procedimento

1. Fechar as gavetas e a campânula.
2. Ligar o QIASymphony SP e aguardar até que apareça o ecrã "Sample Preparation" (Preparação de amostras) e o procedimento de inicialização esteja concluído.
Nota: o interruptor de alimentação está localizado no canto inferior esquerdo do QIASymphony SP.
3. Iniciar sessão no equipamento.
4. É necessário certificar-se de que a gaveta "Waste" (Resíduos) está preparada adequadamente e efectuar uma leitura do inventário da gaveta "Waste" (Resíduos), incluindo a manga de pontas e o recipiente de desperdícios líquidos. Se for necessário, substituir o saco de eliminação de pontas.
5. Carregar a rack de eluição necessária para a gaveta "Eluate" (Eluato).
Não carregar uma placa de 96 poços para "Elution slot 4" (Ranhura de eluição 4).
Utilizar "Elution slot 1" (Ranhura de eluição 1) apenas com o adaptador de arrefecimento correspondente.
Ao utilizar uma placa de 96 poços, é necessário certificar-se de que a placa tem a orientação correcta, pois a colocação errónea pode causar a mistura de amostras na análise a jusante.
6. Carregar o(s) cartucho(s) de reagentes e consumíveis necessários para a gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis).
Nota: é necessário certificar-se de que as pontas de pipetagem estão fixadas correctamente.
7. Executar uma leitura de inventário da gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis).
8.  Transferir **300 µl** da amostra de sangue total a ser extraída para um micro tubo (2,0 ml tipo H) e colocá-lo no adaptador 3b de 2 ml, no transportador de tubos de ensaio. Carregar os tubos de amostras para a gaveta "Sample" (Amostra).
9. Mediante a utilização do ecrã táctil, inserir as informações necessárias para cada lote de amostras a ser processado:
 - informações de amostras: alterar o formato de tubos predefinido (escolher o botão "Select All" (Seleccionar tudo) e seleccionar "Sarstedt reference 72.694" (Referência Sarstedt 72 694) da tabela "Tube Insert" (Insero de tubo));
 - Protocolo a ser executado: escolher o botão "Select All" (Seleccionar tudo) e seleccionar a categoria "DNA Blood" (Sangue de ADN) → Blood_200_V7_DSP para a amostra de sangue total



- volume de eluição e posição de saída: 100 µl para o protocolo de sangue total.

Nota: assim que as informações sobre o lote sejam inseridas, o estado é alterado de "LOADED" (carregado) para "QUEUED" (em fila de espera). Assim que um lote fique em fila de espera, aparece o botão "Run" (Executar).

10. Iniciar a execução.

- Para iniciar a execução, premir o botão "Run" (Executar).
- Ler e confirmar a mensagem que aparece.

Nota: recomendamos que o utilizador aguarde junto ao equipamento, até que este tenha executado a detecção do nível de líquido dos tubos de controlo interno e o estado do transportador de QIASymphony SP seja alterado para "RUNNING" (em execução).

Nota: não efectuar uma pausa nem parar a execução durante o processamento (a menos que ocorra uma emergência), pois isso levaria a que as amostras fossem assinaladas com o alarme "unclear" (ambíguo).

Nota: é possível carregar continuamente amostras e adicioná-las a esta execução (até que os reagentes estejam carregados). Premir o botão "Run" (Executar) para iniciar o procedimento de purificação.

11. No final da execução do protocolo, o estado do lote é alterado de "RUNNING" (em execução) para "COMPLETED" (concluído). Recuperar a rack de eluição que contém os ácidos nucleicos purificados a partir da gaveta "Eluate" (Eluato).

Recomendamos a remoção da placa de eluição da gaveta "Eluate" (Eluato) imediatamente após a conclusão da execução. Dependendo da temperatura e humidade, as placas de eluição deixadas no QIASymphony SP após a conclusão da execução poderão sofrer condensação ou evaporação.

Nota: geralmente, as partículas magnéticas não passam para os eluatos. Se algum eluato tiver partículas pretas, as partículas magnéticas poderão ser removidas da seguinte forma: aplicar o tubo que contém o ADN num separador magnético adequado (por exemplo, QIAGEN 12-Tube Magnet (ímã para 12 tubos da QIAGEN), ref.º 36912) até que as partículas magnéticas estejam separadas. Se o ADN estiver em microplacas, aplicar a microplaca num separador magnético adequado (por exemplo, QIAGEN 96-Well Magnet Type A (ímã de 96 tubos da QIAGEN de tipo A), ref.º 36915) até que as partículas magnéticas estejam separadas. Se não estiver disponível qualquer separador magnético adequado, centrifugar o tubo que contém o ADN durante 1 minuto a toda a velocidade numa microcentrifugadora para formar uma esfera com as partículas magnéticas que restem.

12. Exportar o ficheiro do resultado de QIASymphony SP: este relatório é gerado para cada placa de eluição.
 - Inserir o dispositivo de armazenamento de dados USB numa das portas USB, na parte da frente de QIASymphony SP;
 - clicar no botão "Tools" (Ferramentas);
 - seleccionar "File Transfer" (Transferência de ficheiro);
 - no separador "In-/Output Files" (Ficheiros de entrada/saída), seleccionar "Results Files" (Ficheiros de resultados) e clique "Transfer" (Transferir).Mantenha o nome de exportação do ficheiro, no seguinte formato: aaaa-mm-dd hh:mm:ss_ID de rack de eluição.
13. Verificar a coluna "Validity of result" (Validade de resultado) para cada amostra no ficheiro de resultados QIASymphony SP
 - Estado válido e ambíguo: prosseguir para a qualificação e quantificação de ADN
 - Estado inválido: a amostra é rejeitada. Processar novamente o passo de extracção.
14. Se um cartucho de reagentes estiver apenas utilizado parcialmente, selar o cartucho com as tiras de vedante reutilizáveis fornecidas e fechar os tubos que contenham protease K com tampas de rosca, imediatamente após o final da execução do protocolo, para evitar a evaporação.
15. Eliminar os tubos de amostras e as placas utilizados e os desperdícios, de acordo com os regulamentos de segurança locais.
16. Limpar o QIASymphony SP.

Seguir as instruções de manutenção dos manuais de utilizador fornecidos juntamente com o seu equipamento. É necessário certificar-se de que limpa regularmente as protecções das pontas para minimizar o risco de contaminação cruzada.
17. Fechar as gavetas do equipamento e desligar o QIASymphony SP.

Qualificação e quantificação de ADN

Deve ser utilizado um tampão AE ou ATE em branco para calibrar o espectrofotómetro. É necessário utilizar estes tampões porque os tampões de eluição utilizados nos kits de extracção de ADN genómico contêm azida de sódio conservante, a qual absorve a uma temperatura de 260 nm.

- O rácio de A_{260}/A_{280} deve ser $\geq 1,7$, pois os rácios inferiores a este indicam normalmente contaminação por proteínas ou a presença de químicos orgânicos e afecta o passo PCR.
- A quantidade de ADN é determinada medindo a densidade óptica a 260 nm.
- Quantidade total de ADN purificado = concentração x volume de amostra em μl .
- Se o rácio de A_{260}/A_{280} estiver abaixo de 1,7 e se a concentração de ADN genómico estiver abaixo de 10 ng/ μl , o processamento da amostra não deverá prosseguir.

Normalização de amostras de ADN genómico

O ADN deve ser diluído em 10 ng/ μl no tampão TE fornecido no kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR.

O Rotor-Gene Q PCR é optimizado para 50 ng de ADN genómico purificado diluído num volume final de 5 μl .

Protocolo: qPCR em equipamento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR deve ser executado no equipamento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, utilizando Rotor-Gene AssayManager v2.1. É conveniente familiarizar-se durante algum tempo com o equipamento Rotor-Gene Q MDx antes de iniciar o protocolo. Para mais detalhes, consultar os manuais de utilizador do equipamento, do Rotor-Gene AssayManager v2.1 e do Gamma Plug-in.
- O Rotor-Gene AssayManager v2.1 permite a interpretação automatizada dos resultados de PCR. Os parâmetros de ciclagem estão bloqueados para a execução.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

O Rotor-Gene AssayManager versão de software 2.1 tem de estar instalado no computador ligado ao Rotor-Gene Q e pode ser transferido do website da QIAGEN: www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx. Para saber detalhes sobre a instalação do software Rotor-Gene AssayManager v2.1 core, consultar o *Manual do Utilizador Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

- O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR necessita especificamente do Gamma Plug-in. É possível fazer o download deste plug-in a partir da página do website da QIAGEN: www.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. Este plug-in deve ser instalado num computador que já tenha a versão 2.1 de Rotor-Gene AssayManager instalada.
- O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR também necessita de um perfil de ensaios. Este perfil de ensaios (ficheiro .iap) contém todos os parâmetros necessários para efectuar a ciclagem e análise do ensaio qPCR. É possível fazer o seu download a partir da página do website da QIAGEN dedicada ao kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR: www.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. É necessário importar o perfil de ensaios no software Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Nota: o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR apenas pode ser executado se estiverem programadas determinadas definições de configuração no software de Rotor Gene AssayManager.

Para obter uma segurança de processos em todo o sistema, devem ser definidas as seguintes definições de configuração necessárias para o modo fechado:

- "Material number required" (Número do material necessário);
- "Valid expiry date required" (Data de validade necessária);
- "Lot number required" (Número de lote necessário).

Instalação de Gamma Plug-in e importação de perfil de ensaios

As informações sobre a instalação e a importação do Gamma Plug-in e do perfil de ensaios estão detalhadas nos manuais de utilizador *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* e *Gamma Plug-in*.

- Fazer o download de Gamma Plug-in e da última versão do perfil de ensaios de JAK2 CE a partir do website da QIAGEN.
- Iniciar o processo de instalação, fazendo duplo clique no ficheiro RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi e seguindo as instruções de instalação. Para obter uma descrição detalhada deste processo, consultar a secção sobre "instalação de plug-ins" no *Manual do Utilizador Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Nota: para obter uma segurança de processos em todo o sistema, seleccionar o separador "Settings" (Definições) e verificar as caixas "Material number required" (Número do material necessário), "Valid expiry date required" (Data de validade necessária) e "Lot number required" (Número de lote necessário) para o modo fechado (secção Work list (Lista de trabalho)). Se não estiverem activadas (checked (verificado)), clicar para activar.

- Após a instalação com sucesso do plug-in, uma pessoa que tenha direitos de administrador para o software Rotor-Gene AssayManager v2.1 irá necessitar de importar o perfil de ensaios ipsogen_JAK2_blood_CE, do seguinte modo:
 1. Iniciar sessão no software Rotor-Gene AssayManager como utilizador com direitos de administrador.
 2. Seleccionar o ambiente de configurações.
 3. Seleccionar o separador "Assay Profiles" (Perfis de ensaios).
 4. Clicar no botão "Import" (Importar).
 5. Seleccionar o perfil de ensaios ipsogen_JAK2_blood_CE a ser importado no diálogo e clicar "Open" (Abrir).
 6. Assim que o perfil de ensaios tenha sido importado com êxito, pode ser utilizado no ambiente "Setup" (Configuração).

Nota: a mesma versão de um perfil de ensaios não pode ser importada duas vezes.

Processamento de amostras em equipamentos Rotor-Gene Q MDx com rotor de 72 tubos

Recomendamos o teste de oito amostras de ADN genómico no mesmo ensaio para otimizar a utilização dos controlos, padrões e misturas de reacções.

A Tabela 2 indica o número de reacções que podem ser executadas utilizando o rotor de 72 tubos.

O esquema mostrado na Figura 3 fornece um exemplo da configuração de um rotor ou bloco de carregamento para um ensaio com o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR.

Os números representam as posições no bloco de carregamento e indicam a posição final do rotor.

Tabela 2. Número de reacções para os equipamentos Rotor-Gene Q MDx com rotor de 72 tubos

Amostras	Número de reacções
Com a Mistura da reacção de JAK2 MT	
8 amostras de ADN genómico	8
Padrões quant. de JAK2 MT	4
Controlo de JAK2 MT (mutante)	1
Controlo de JAK2 WT (tipo selvagem)	1
Water for no template control (NTC) (água para controlo sem modelo (NTC))	1
Com a Mistura da reacção de JAK2 WT	
8 amostras de ADN genómico	8
Padrões quant. de JAK2 WT (tipo selvagem)	4
Controlo de JAK2 MT (mutante)	1
Controlo de JAK2 WT (tipo selvagem)	1
Water for NTC (Água para NTC)	1

1	WT QS1	9	MT C	17	S2	25	S6	33		41		49		57		65	
2	MT QS1	10	MT C	18	S2	26	S6	34		42		50		58		66	
3	WT QS2	11	WT C	19	S3	27	S7	35		43		51		59		67	
4	MT QS2	12	WT C	20	S3	28	S7	36		44		52		60		68	
5	WT QS3	13	NT C	21	S4	29	S8	37		45		53		61		69	
6	MT QS3	14	NT C	22	S4	30	S8	38		46		54		62		70	
7	WT QS4	15	S1	23	S5	31		39		47		55		63		71	
8	MT QS4	16	S1	24	S5	32		40		48		56		64		72	

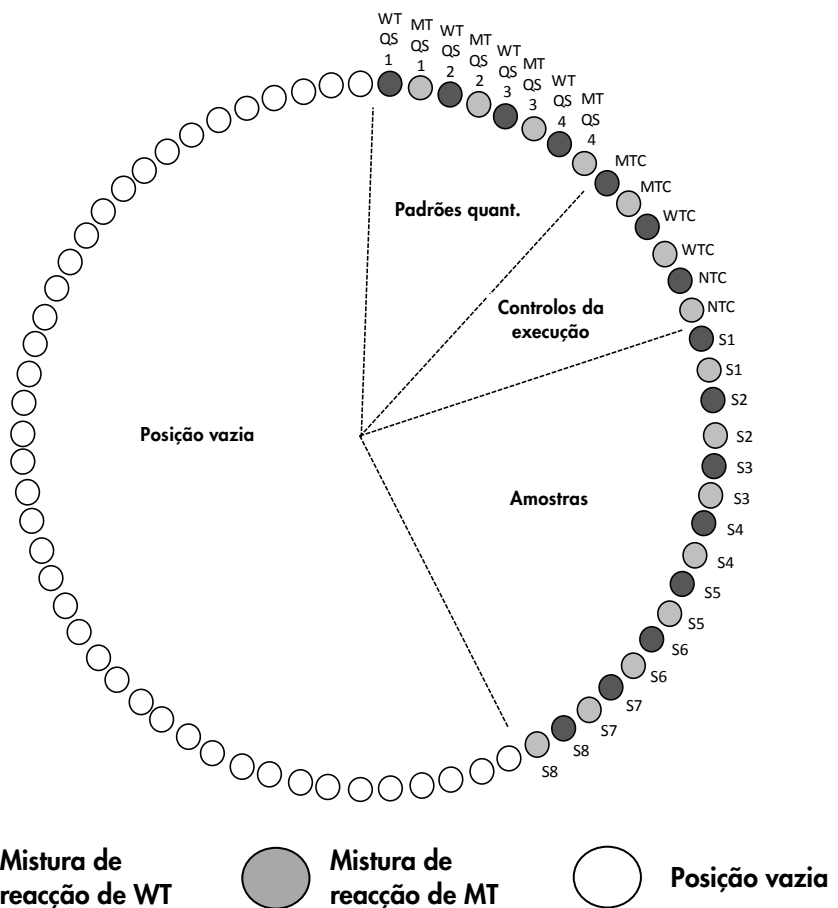


Figura 3. Configuração de rotor e placa para um ensaio com o kit *ipsogen* JAK2 RQ PCR. WTC: controlo de JAK2 WT; MTC: controlo de JAK2 MT; QS WT: padrões JAK2 WT; MT-QS: padrões quant. de JAK2 MT; S: amostra de ADN genómico; NTC: controlo sem modelo (água).



Os tubos devem ser inseridos no rotor, tal como está indicado na Figura 3, pois a análise automatizada definida no perfil de ensaios é baseada nesta organização. Se for utilizado um esquema diferente, serão obtidos resultados anómalos.

Nota: preencher todas as posições restantes com tubos vazios.

qPCR em equipamentos Rotor-Gene Q MDx com rotor de 72 tubos

1. Criar uma lista de trabalho para as amostras a serem processadas do seguinte modo.

- Ligar o equipamento Rotor-Gene Q MDx.
- Abrir o software Rotor-Gene AssayManager v2.1 e iniciar sessão como utilizador com a função de operador no modo fechado.
- Clicar no botão "New work list" (Nova lista de trabalho) no gestor de listas de trabalho (ambiente "Setup" (Configuração)).
- Seleccionar "Perfil de ensaios JAK2 CE" da lista de perfis de ensaios disponíveis, no passo "Ensaio".
- Clicar no botão "Move" (Deslocar) para transferir o perfil de ensaios seleccionado para a lista "Selected assay profiles" (Perfis de ensaios seleccionados). O perfil de ensaios deve aparecer agora na lista de perfis de ensaios seleccionados.
- Inserir o número de amostras no campo correspondente.
- Inserir as seguintes informações do kit de JAK2, que estão impressas na tampa da caixa
 - Número do material: 1079182
 - Data de validade
 - Número de lote.Como alternativa, o código de barras do kit pode ser introduzido ou lido.
- Seleccionar o passo "Samples" (Amostras). É mostrada uma lista com os detalhes de amostras. A lista representa o esquema esperado do rotor.
- Inserir o(s) número(s) de identificação da amostra na lista, assim como qualquer informação opcional sobre a amostra, tal como um comentário para cada amostra.
- Seleccionar o passo "Properties" (Propriedades) e inserir um nome para a lista de trabalho.
- Activar a caixa de verificação "is applicable" (é aplicável).
- Guardar a lista de trabalho.
- A lista de trabalho pode ser impressa e isso poderá ajudar na preparação e configuração de qPCR. Para imprimir a lista de trabalho, premir o botão "Print work list" (Imprimir lista de trabalho). Os detalhes de amostras estão incluídos como parte desta lista de trabalho.

Nota: a lista de trabalho pode ser criada assim que o ensaio esteja definido no equipamento ou antes de adicionar as amostras ao equipamento, uma vez o ficheiro da lista de trabalho pode ser guardado.

2. Configurar o ensaio qPCR.

- Descongelar todos os componentes necessários excepto a polimerase Taq do ADN, que deve ser mantida no congelador quando não estiver a ser utilizada. Colocar os tubos que contêm os componentes a serem descongelados no gelo.

Nota: não exceder 30 minutos no passo de descongelamento para evitar qualquer degradação de material.

- Limpar a área da bancada dedicada à preparação da mistura de PCR para assegurar que não há contaminação de modelos nem de nuclease.
- Misturar com cuidado, invertendo 10 vezes os tubos que contenham misturas de reacção, controlos e padrões e centrifugar os mesmos brevemente antes da respectiva utilização.

3. Preparar as seguintes misturas de qPCR, de acordo com o número de amostras a serem processadas.

Todas as concentrações são para o volume final da reacção.

As Tabela 3 e Tabela 4 descrevem o esquema de pipetagem para a preparação de misturas MT e WT, calculado para obter volumes de reacção final de 25 µl. Estão incluídos volumes suplementares para compensar erros de pipetagem e abranger 8 amostras e controlos.

Tabela 3. Preparação de misturas qPCR para a detecção de sequências mutantes de JAK2

Componente	1 reacção (µl)	15+1* reacções (µl)	Concentração final
Mistura da reacção de JAK2 MT	19,8	316,8	1x
Polimerase Taq de ADN	0,2	3,2	1x
Amostra (a ser adicionada no passo 4)	5	5 cada	–
Volume total	25	25 cada	–

* Um volume de reacção suplementar é incluído como volume morto.

Tabela 4. Preparação de misturas qPCR para a detecção de sequências de tipo selvagem de JAK2

Componente	1 reacção (µl)	15+1* reacções (µl)	Concentração final
Mistura de reacção de JAK2 WT	19,8	316,8	1x
Polimerase Taq de ADN	0,2	3,2	1x
Amostra (a ser adicionada no passo 4)	5	5 cada	–
Volume total	25	25 cada	–

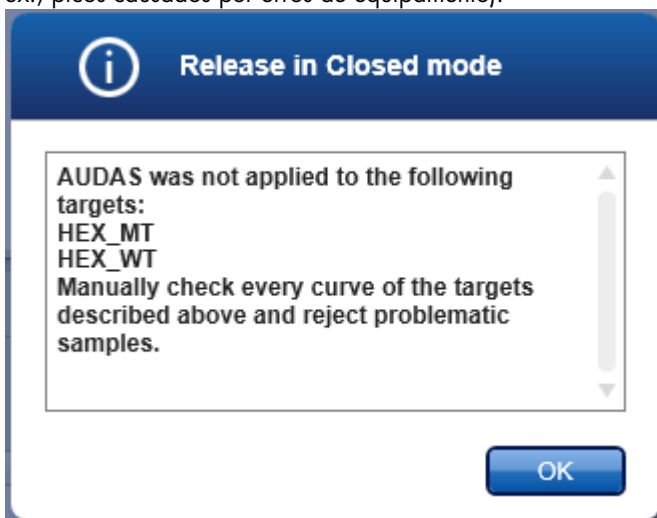
* Um volume de reacção suplementar é incluído como volume morto.

- Agitar no vórtex e centrifugar brevemente antes de distribuir 20 µl da pré-mistura de qPCR por tubo de tira.

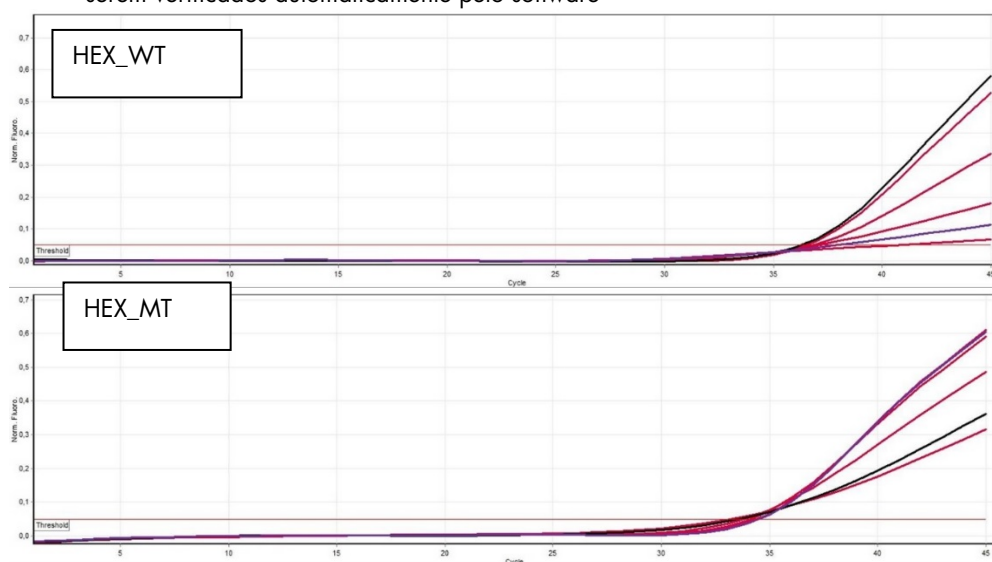
- Agitar no vórtex e centrifugar brevemente o ADN (amostras de ADN genómico + QS e controlos). Depois, adicionar 5 µl de material a ser quantificado ao respectivo tubo correspondente para obter um volume total de 25 µl. Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.
 - **Nota:** é necessário ter cuidado ao alterar pontas entre cada tubo, para evitar qualquer contaminação não específica de misturas de reacção ou modelos, e assim resultados falso-positivos.
 - Voltar a colocar todos os componentes do kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR no congelador, para evitar qualquer degradação de materiais.
4. Preparar o Rotor-Gene Q MDx e iniciar a execução do seguinte modo.
- Coloque um rotor de 72 poços no suporte de rotor do Rotor-Gene Q MDx.
 - Encher o rotor com tubos de tiras, de acordo com as posições atribuídas, começando na posição 1, como mostra a Figura 3, com tubos de tiras com tampas vazios colocados em todas as posições não utilizadas.
Nota: é necessário certificar-se de que o primeiro tubo está inserido na posição 1 e os tubos de tiras estão colocados na orientação e posições correctas, tal como mostra a Figura 3.
 - Anexar o anel de aperto.
 - Carregar o equipamento Rotor-Gene Q MDx com o rotor e o anel de aperto e fechar a tampa do equipamento.
 - No software de Rotor-Gene AssayManager v2.1, seleccionar a lista de trabalho correspondente a partir do gestor de listas de trabalho e clicar no botão "Apply" (Aplicar) ou, se a lista de trabalho ainda estiver aberta, clicar no botão "Apply" (Aplicar).
Nota: se a lista de trabalho dedicada do ensaio não tiver sido criada, iniciar sessão em Rotor-Gene AssayManager v2.1 e seguir o passo 2 antes de proceder do seguinte modo.
 - Inserir o nome do ensaio.
 - Seleccionar o ciclador a ser utilizado na "Cycler selection" (Seleção de cicladores).
 - Verificar se o anexo de anel de aperto é efectuado correctamente e confirmar no ecrã que o anel de aperto está anexado.
 - Clicar no botão "Start run" (Iniciar execução).
 - A execução de JAK2 RGQ PCR deve iniciar.
5. Faça o seguinte para terminar a execução.
- Quando a execução estiver concluída, clicar em "Finish run" (Concluir execução).
 - Libertar e aprovar a execução:
 - para utilizadores com sessão iniciada com a função de Aprovador: clicar em "Release and go to approval" (Libertar e ir para a aprovação);
 - para utilizadores com sessão iniciada com a função de Operador: clicar em "Release" (Libertar).

6. Libertar resultados.

- Se tiver sido efectuado um clique em "Release and go to approval" (Libertar e ir para a aprovação), serão apresentados os resultados do ensaio.
- É apresentado o seguinte alerta AUDAS (Automatic Data Scan (Leitura automática de dados)). Verifique os alvos HEX manualmente na secção "Plots and Information" (Gráficos e informações) das curvas de dados não processados, para ver se existem anomalias (por ex., picos causados por erros de equipamento).



Chamamos a atenção para o facto de as curvas dos alvos HEX de controlo interno não apresentarem formas tipicamente sigmóides (semelhantes às curvas exemplificativas abaixo apresentadas) e terem de ser consideradas curvas válidas. Chamamos a atenção para o facto de todos os outros critérios de validade interna (por exemplo, cutoffs C_T) serem verificados automaticamente pelo software



- Se um utilizador com função de utilizador tiver clicado em "Release" (Libertar), alguém com a função de "Approver" (Aprovador) terá de iniciar sessão e seleccionar o ambiente "Approval" (Aprovação).
 - Filtrar para o ensaio a ser aprovado seleccionando as opções de filtro e clicando no botão "Apply" (Aplicar).
 - É apresentado o alerta AUDAS (Automatic Data Scan) acima referido. Verifique os alvos HEX manualmente na secção "Plots and Information" (Gráficos e informações) das curvas de dados não processados, para ver se existem anomalias (por ex., picos causados por erros de equipamento).
 - Chamamos a atenção para o facto de as curvas dos alvos HEX de controlo interno não apresentarem formas tipicamente sigmóides (semelhantes às curvas exemplificativas acima apresentadas) e terem de ser consideradas curvas válidas. Chamamos a atenção para o facto de todos os outros critérios de validade interna (por exemplo, cutoffs C_T) serem verificados automaticamente pelo software.
 - Rever os resultados e clicar no botão "Release/Report data" (Libertar/Reportar dados).
 - Clicar em "OK". O relatório será gerado em formato .pdf e armazenado automaticamente na pasta predefinida.

Por predefinição, o caminho desta pasta é:

QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Nota: este caminho e esta pasta podem ser alterados no ambiente "Configuration" (Configuração).

Nota: para efectuar a resolução de problemas, é necessário um pacote de suporte da execução. Os pacotes de suporte podem ser gerados a partir do ambiente de arquivo ou aprovação (Manual do Utilizador Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual*), secção "Troubleshooting" (Resolução de problemas), "Creating a support package" (Criação de um pacote de suporte). Além disso, o registo de auditoria da hora do incidente ± 1 dia poderá ser útil. O registo de auditoria pode ser recuperado no Ambiente de serviço (Manual do Utilizador Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual*), Secção 1.5.5.5).

7. Descarregar o equipamento Rotor-Gene Q MDx e eliminar os tubos de tiras de acordo com os regulamentos de segurança locais.

Interpretação de resultados

A análise é totalmente automatizada.

Os resultados das amostras de teste são analisados * automaticamente e definidos pelo Rotor-Gene AssayManager v2.1, devendo, ainda, ser aprovados e libertados pelo utilizador com sessão iniciada com a função de aprovador.

Os resultados das amostras a serem aprovados têm três botões de aprovação suplementares no final da coluna correspondente. Estes botões são utilizados para aceitar ou rejeitar dinamicamente os resultados das amostras. Para obter mais informações, consulte o *Manual do Utilizador do Gamma Plug-in*.

O Rotor-Gene AssayManager v2.1 irá analisar depois os controlos de execução:

- o NTC é verificado relativamente à ausência de amplificação específica (JAK2 WT e JAK2 MT), e à presença de amplificação do controlo interno;
- QS MT e WT: a validação é baseada nos valores de declive e R^2 de cada;
- WTC: o número total de cópias de JAK2 (TCN) deve ser suficientemente elevado para que este controlo seja interpretado. Se for esse o caso, será calculada a percentagem de mutação de JAK2. Este controlo de execução é validado se o respectivo estado for WT, de acordo com o teste;
- MTC: o número total de cópias de JAK2 deve ser suficientemente elevado para que este controlo seja interpretado. Se for esse o caso, será calculada a percentagem de mutação de JAK2. Este controlo de execução é validado se o respectivo estado for altamente positivo para a mutação JAK2.

Nota: o relatório gerado no final da execução mostra os resultados obtidos em controlos de execução, com alarmes de invalidação à frente dos dados inválidos.

Se todos os controlos da execução estiverem em conformidade, o Rotor-Gene AssayManager v2.1 irá analisar as amostras desconhecidas.

- Na amostra, o número total de cópias deve ser suficientemente elevado para que os resultados sejam interpretados. A percentagem de mutação de JAK2 será depois calculada e o resultado será apresentado. Se não for observada qualquer amplificação específica num

* Activado apenas para alvos FAM.

tubo (WT ou MT), será verificada a amplificação do controlo interno para assegurar que isto não é um artefacto. Deve ser observado pelo menos um valor CT em cada tubo (WT e MT) para que uma amostra seja validada pelo Rotor-Gene AssayManager v2.1, e para que o resultado correspondente seja válido.

Nota: se os controlos de execução e os resultados de amostras forem válidos, o relatório irá mostrar o número de cópias e a percentagem de mutação à frente de cada amostra.

- A Tabela 5 mostra os alarmes de invalidação de amostras que podem ser atribuídos a um tubo individual durante a análise efectuada pelo Rotor-Gene AssayManager v2.1, juntamente com uma explicação sobre o significado desses alarmes.

A Tabela 6 (page 38) mostra os alarmes de aviso de amostras e a descrição dos termos.

Tabela 5. Alarmes de invalidação de amostras e descrição de termos

Alarme	Descrição
ANALYSIS_FAILED	O ensaio foi definido como inválido porque a análise falhou. Contacte os Serviços Técnicos da QIAGEN.
ASSAY_INVALID	O ensaio é inválido porque pelo menos um controlo externo é inválido.
CONSECUTIVE_FAULT	O alvo utilizado para o cálculo deste alvo é inválido
CURVE_SHAPE_ANOMALY	A curva de amplificação de dados não processados mostra uma forma que se desvia do comportamento estabelecido para este ensaio. Existe uma elevada probabilidade de ocorrerem resultados erróneos ou uma interpretação errónea de resultados.
FLAT_BUMP	A curva de amplificação de dados não processados mostra a forma de uma lomba plana que se desvia do comportamento estabelecido para este ensaio. Existe uma elevada probabilidade de ocorrerem resultados erróneos ou uma interpretação errónea de resultados (por exemplo, determinação de valor C_T errónea).
INVALID_CALCULATION	O cálculo para este alvo falhou.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	O valor C_T detectado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo mutante com a mistura de reacção de tipo selvagem.
MC_IC_LOW_CT (WT)	O valor C_T detectado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo mutante com a mistura de reacção de tipo selvagem.
MC_IC_NO_CT (MT)	Nenhum C_T detectável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo mutante com a mistura de reacção mutante.
MC_IC_NO_CT (WT)	Nenhum C_T detectável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo mutante com a mistura de reacção de tipo selvagem.
MC_LOW_CN	O número de cópias para o controlo mutante é demasiado baixo.
MC_LOW_PERCENTAGE	A percentagem de mutações do controlo mutante é demasiado baixa.
MC_NO_CN	Não existe número de cópias para o controlo mutante.
MC_NO_CT (MT)	C_T não detectável para o controlo mutante com a mistura de reacção mutante.
MC_NO_VALUE	A percentagem de mutações do controlo mutante não tem qualquer valor.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	A curva de amplificação passa o limiar mais do que uma vez. Um C_T não ambíguo não pode ser determinado.
NO_BASELINE	Não foi encontrada qualquer linha de base inicial. Não foi possível efetuar a análise subsequente.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	O valor C_T detectado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reacção mutante.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	O valor C_T detectado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reacção de tipo selvagem.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Nenhum C_T detectável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reacção mutante.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Nenhum C_T detectável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reacção de tipo selvagem.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	O valor C_T detectado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reacção mutante.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	O valor C_T detectado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo sem modelo com a mistura de reacção de tipo selvagem.

Alarme	Descrição
NTC_UNEXPECTED_VALUE	Foi detectado C_T no controlo sem modelo.
OTHER_TARGET_INVALID	Um outro alvo para a mesma amostra é inválido.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	A concentração calculada para este exemplo excede o limite técnico.
QS_HIGH_SLOPE (MT)	O limite superior do declive de mutante é excedido.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	O limite superior do declive de tipo selvagem é excedido.
QS_IC_NO_CT (WT)	Nenhum C_T detectável para o controlo interno no mesmo tubo que um ou mais padrões de quantificação de tipo selvagem.
QS_LOW_SLOPE (MT)	O limite inferior do declive de mutante não é atingido.
QS_LOW_SLOPE (WT)	O limite inferior do declive de tipo selvagem não é atingido.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	O limite inferior do R^2 de mutante não é atingido.
QS_LOW_RSQUARED (WT)	O limite inferior do R^2 de tipo selvagem não é atingido.
QS_NO_CT (MT)	Nenhum C_T detectável para um ou mais padrões de quantificação de mutante.
QS_NO_CT (WT)	Nenhum C_T detectável para um ou mais padrões de quantificação de tipo selvagem.
RUN_FAILED	O ensaio foi definido como inválido devido a um problema com o ciclador ou com a ligação do ciclador.
RUN_STOPPED	O ensaio foi definido como inválido porque a execução foi interrompida manualmente.
SAMPLE_LOW_CN	O número de cópias para uma amostra de teste é demasiado baixo.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	O valor C_T detectado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que a amostra de teste com a mistura de reacção mutante.
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	O valor C_T detectado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que a amostra de teste com a mistura de reacção mutante.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Nenhum C_T detectável para o controlo interno no mesmo tubo que uma amostra de teste com a mistura de reacção mutante.
SAMPLE_NO_CN	Nenhum número de cópias para uma amostra de teste.
SAMPLE_NO_VALUE	A percentagem de mutações de uma amostra de teste não tem qualquer valor.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	O valor C_T detectado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que a amostra de teste com a mistura de reacção de tipo selvagem.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	O valor C_T detectado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que a amostra de teste com a mistura de reacção de tipo selvagem.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Nenhum C_T detectável para o controlo interno no mesmo tubo que uma amostra de teste com a mistura de reacção de tipo selvagem.
SATURATION	A fluorescência dos dados não processados está em forte saturação antes do ponto de inflexão da curva de amplificação.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	É detetado um pico na curva de amplificação perto de C_T .
STEEP_BASELINE	É detetada uma linha de base que sobe em flecha para a fluorescência dos dados não processados na curva de amplificação.
STRONG_BASELINE_DIP	É detetada uma forte queda na linha de base para a fluorescência dos dados não processados na curva de amplificação.
STRONG_NOISE	Ruído forte detetado fora da fase ascendente da curva de amplificação.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Ruído forte detectado na fase ascendente (exponencial) da curva de amplificação.

Alarme	Descrição
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	É detetada uma linha de base ondulada para a fluorescência dos dados não processados na curva de amplificação.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	A percentagem de mutações do controlo de tipo selvagem é demasiado elevada.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	O valor C_T detetado é superior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo de tipo selvagem com a mistura de reacção mutante.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	O valor C_T detetado é inferior ao esperado para um controlo interno no mesmo tubo que o controlo de tipo selvagem com a mistura de reacção mutante.
WTC_IC_NO_CT (MT)	Nenhum C_T detectável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo de tipo selvagem com a mistura de reacção mutante.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Nenhum C_T detectável para o controlo interno no mesmo tubo que o controlo de tipo selvagem com a mistura de reacção de tipo selvagem.
WTC_LOW_CN	O número de cópias para o controlo de tipo selvagem é demasiado baixo.
WTC_NO_CT (WT)	C_T não detectável para o controlo de tipo selvagem com a mistura de reacção de tipo selvagem.
WTC_NO_CN	Não existe número de cópias para o controlo de tipo selvagem.
WTC_NO_VALUE	A percentagem de mutações do controlo de tipo selvagem não tem qualquer valor.

Tabela 6. Alarmes de advertência de amostras e descrição de termos

Alarme	Descrição
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	A alteração da percentagem de fluorescência para esta amostra relativamente ao tubo de amostra com a maior alteração de fluorescência é inferior a um limite definido.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	A eficiência da reacção para esta amostra não atingiu um limite definido.
SPIKE	É detetado um pico na fluorescência de dados não processados na curva de amplificação mas fora da região onde C_T é determinado.

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a esclarecer quaisquer dúvidas que possa ter sobre as informações e protocolos constantes deste manual de instruções ou sobre as tecnologias de amostras e testes (para informações de contacto, consulte "Informações de contacto", na página 48).

Para obter informações sobre a resolução de problemas relativamente aos kits de extracção QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (ref.º 61104) e QIASymphony DNA DSP Mini Kit (ref.º 937236), consultar os respectivos manuais.

Comentários e sugestões

Extracção automatizada

Amostra assinalada com o alarme "unclear" (ambíguo)	O motivo poderá ser uma pausa efectuada durante a execução de extracção. Se a execução de extracção estava concluída, prosseguir para o passo de medição da concentração e rácio de OD. Caso contrário, repetir a execução de extracção.
Amostra assinalada com o alarme "unprocessed" (não processado)	Isto refere-se a um erro inicial de volume de amostra. Verificar o volume de sangue mediante a pipetagem. Se o volume estiver demasiado baixo, aumentá-lo para que a amostra tenha 300 µl e reiniciar a execução.
Amostra assinalada com o alarme "invalid" (inválido)	Ocorreu um erro durante a execução de extracção. Repetir o passo de extracção para esta amostra.
Erro de temperatura de bloco de refrigeração	Uma mensagem de erro no final da execução relativamente à temperatura de refrigeração significa que as amostras foram mantidas à temperatura ambiente (15–25 °C) desde o final da execução de extracção. Se as amostras tiverem sido mantidas à temperatura ambiente durante < 12 horas, a qualidade do ADN genómico não deve ter sido alterada e o ADN genómico pode ser quantificado. Se > 12 horas, as amostras de ADN genómico podem ter ficado degradadas. Se for esse o caso, repetir a extracção.
Erro de remoção de placa de eluição	No final da execução, pode aparecer uma mensagem de erro se a placa de eluição tiver sido removida sem a verificação da operação relevante no ecrã. Isto pode ser rectificado, ao clicar na caixa relevante.

Manuseamento geral para a avaliação do estado da mutação JAK2, utilizando o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR

O número total de cópias não está em conformidade e a amostra correspondente é inválida: a amplificação é demasiado baixa

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Verificar o rácio A_{260}/A_{280} | Se for <1,7, executar uma nova extracção de ADN. |
| b) Verificar a concentração de ADN | O kit <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR é optimizado para uma concentração funcional de 10 ng/µl. Se a concentração de ADN não estiver nesta concentração, diluir ou extrair novamente ADN do sangue total. |
| c) Se ambos os parâmetros estiverem em conformidade, os volumes de pipetagem podem ser erróneos | Verificar e calibrar novamente as pipetas antes de repetir o passo qPCR. |

O controlo de execução falha num padrão QS

Comentários e sugestões

a)	Inversão do frasco	Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reacção.
b)	Inversão durante a distribuição	Conservar os conteúdos do kit entre -15 e -30 °C e manter as misturas de reacção protegidas da luz.
c)	Contaminação cruzada	Evitar um congelamento e descongelamento repetidos.
d)	Degradação parcial do padrão	
e)	Reagentes PCR parcialmente degradados	
f)	Amplificação não específica	
Nenhum sinal ou sinal baixo para um padrão		
a)	Problema de distribuição	Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reacção.
b)	Utilização da mesma mistura de reacção para QS WT e MT	Repetir a execução de PCR.
O Controlo sem modelo (NTC) de H₂O é positivo		
a)	Contaminação cruzada	Substituir todos os reagentes críticos.
b)	Contaminação de reagente	Manusear sempre as amostras, componentes do kit e consumíveis de acordo com as práticas normalmente aceites para evitar a contaminação por transporte.
c)	Inversão de tubo de tira	Manter as misturas de reacção protegidas da luz.
d)	Degradação da amostra	Verificar a existência de falsos positivos na curva de fluorescência.
Sem sinal, mesmo nos controlos-padrão		
	Erro de pipetagem ou reagentes ausentes	Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reacção. Repetir a execução de PCR.
Sinais ausentes ou baixos nas amostras, mas a execução dos controlos é boa		
	Efeitos inibidores do material da amostra provocados por uma purificação insuficiente	Verificar sempre a qualidade do ADN, medindo a concentração e o rácio A_{260}/A_{280} antes de iniciar. Repetir a preparação do ADN.
O Controlo de tipo selvagem (WTC) é positivo, mas o Controlo mutante (MTC) não é suficientemente positivo		
	Contaminação por transporte	Substituir todos os reagentes críticos. Repetir o ensaio com novas alíquotas de todos os reagentes. Manusear sempre as amostras, componentes do kit e consumíveis de acordo com as práticas normalmente aceites para evitar a contaminação por transporte. É necessário certificar-se de que as pontas são alteradas entre a pipetagem de reagentes diferentes.
Sinal de Controlo de tipo selvagem (WTC) ou Controlo mutante (MTC), na utilização de misturas de reacção recíprocas		
a)	Contaminação cruzada	Substituir todos os reagentes críticos.
b)	Contaminação de reagente	Repetir o ensaio com novas alíquotas de todos os reagentes.
c)	Inversão de tubo	Manusear sempre as amostras, componentes do kit e consumíveis de acordo com as práticas normalmente aceites para evitar a contaminação por transporte. Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reacção.
Deteção invertida do controlo positivo		
a)	Contaminação cruzada	Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reacção.
b)	Inversão da distribuição da mistura de reacção no tubo ou na pré-mistura	
Sem sinal para uma amostra ou controlo, incluindo o controlo interno		
a)	Mistura de reacção não adicionada	Verificar o esquema de pipetagem e a configuração da reacção. Se o controlo interno não estiver amplificado, isso significa que a mistura de reacção não foi adicionada ou está degradada.
b)	Mistura de reacção degradada	Repetir o passo qPCR com uma nova mistura de reacção.

Nota: se o problema não puder ser atribuído a nenhuma das causas acima referidas ou se a acção correctiva sugerida não resolver o problema, contacte a Assistência Técnica da QIAGEN para se aconselhar.

Controlo de qualidade

O controlo de qualidade do kit completo foi efectuado num equipamento Rotor Gene Q MDx 5plex HRM. Este kit é fabricado de acordo com a norma ISO 13485:2012. Os certificados de análise estão disponíveis quando solicitado através de www.qiagen.com/support/.

Limitações

O kit destina-se à utilização profissional.

O produto deve ser utilizado apenas por pessoal com especial formação, especializado em técnicas de biologia molecular e familiarizado com esta tecnologia.

Este kit deve ser utilizado seguindo as instruções constantes deste manual, em combinação com um equipamento validado indicado em "Materiais necessários mas não fornecidos", na página 10.

Deve prestar-se atenção às datas de validade impressas na etiqueta da caixa. Não utilizar componentes fora do prazo de validade.

Todos os reagentes fornecidos no kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR devem ser utilizados apenas com os outros reagentes fornecidos no mesmo kit. A não observância desta diretriz poderá afetar o desempenho.

O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR é validado apenas para sangue total anticoagulado em EDTA de potássio, colhido de doentes com MPN suspeita.

O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR é validado apenas para ser utilizado com QIASymphony DNA DSP Mini Kit (ref.º 937236) ou QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (ref.º 61104).

O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR é válido apenas para utilização com o Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (para PCR) e o QIASymphony SP (para preparação de amostras).

Qualquer outra utilização não indicada deste produto e/ou modificação dos componentes anulará qualquer responsabilidade da QIAGEN.

Todos os resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados em conjunto com outros achados clínicos ou laboratoriais. A ausência da mutação JAK2 V617F/G1849T não exclui a presença de outras mutações JAK2.

O utilizador é responsável por validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório que não estejam cobertos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Características de desempenho

Limite do branco

O limite do branco (LOB) foi determinado, mediante o seguimento da norma CLSI/NCCLS EP17-2A sobre amostras de sangue total saudável, com um estado JAK2 de tipo selvagem (30 amostras, 120 medições/lote, 3 lotes).

Os resultados de LOB estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7. Resumo do limite de resultados de branco

	Limite medido de branco	Limite final de branco
Lote de validação 1	0%	
Lote de validação 2	0%	0%
Lote de validação 3	0%	

Limite de detecção

O limite de detecção (LOD ou sensibilidade analítica) foi determinado com base na "abordagem Probit" descrita na norma CLSI/NCCLS EP17-2A. Neste estudo, foram analisados 6 níveis baixos de mutação para 3 amostras independentes (ADN de sangue total de MPN perfurado em ADN de sangue total de tipo selvagem), com 3 lotes e 60 medições por amostra e por mutação. Os resultados obtidos indicaram que a sensibilidade analítica era 0,042% para mutação JAK2 V617F.

Os resultados de LOD estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8. Resumo do limite de resultados de detecção

	Limite medido de detecção	Limite final de detecção
Lote de validação 1	0,041%	
Lote de validação 2	0,029%	0,042%
Lote de validação 3	0,042%	

Linearidade

A linearidade da quantificação da mutação JAK2 em doentes de MPN foi avaliada de acordo com a norma CLSI/NCCLS EP06AE, com um lote de kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR e com testes em 11 níveis de mutação para 5 entradas de ADN diferentes. A quantificação da carga de mutação JAK2 em amostras de MPN é linear, por exemplo, o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR pode quantificar amostras do valor LOD para 100% de mutação, desde que a concentração da amostra quantificada esteja perto de 10 ng/μl (entre 5 e 20 ng/μl).

Repetibilidade e reprodutibilidade

O estudo de precisão foi efectuado de acordo com a norma CLSI/NCCLS EP5 A2. Os testes foram efectuados em 11 níveis de mutação, cada nível testado em duplicado em 54 execuções efectuadas durante mais de 27 dias, produzindo 108 medições por nível de mutação. Os resultados estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados de precisão

Amostra	Percentagem média de mutação				
	JAK2	DP _{R+}	DP _{EXECUÇÃO++}	DP _{TOTAL+++}	CV _{TOTAL}
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%
S11	0,007	0,01	0,002	0,01	146,84%

R+: Repetibilidade.

EXECUÇÃO++: Entre reprodutibilidade de execuções.

TOTAL+++: Precisão total (incluindo interequipamento, interoperador e interlote).

CV_{TOTAL}: coeficiente de variação para a precisão total (% de JAK2 MT).

Substâncias interferentes

A estrutura do estudo foi baseada em recomendações descritas na norma de NCCLS EP7-A2 "Interference Testing in clinical Chemistry" (Testes de interferência em bioquímica). Um total de 17 substâncias possivelmente presentes em amostras sanguíneas foram escolhidas devido ao seu possível efeito em PCR (bussulfano, bromidrato de citalopram, cloridrato de paroxetina hemihidratado, cloridrato de sertralina, cloridrato de fluoxetina, paracetamol, bilirrubina não conjugada, EDTA de potássio, hemoglobina [humana], triglicéridos, dihidrato de lisinopril, hidroxiureia, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, tiotepa, anagrelida e interferão alfa 2b). Os resultados obtidos não mostraram efeitos interferentes para estas substâncias.

Validação clínica e comparação de métodos

Foi efectuado um estudo que incluiu 65 amostras sanguíneas clínicas de MPN em 2 centros clínicos franceses para comparar o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR com o kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant® da QIAGEN, o qual foi utilizado como método de referência.

Um total de 65 amostras sanguíneas de MPN foram congeladas e descongeladas e o ADN genómico foi extraído. Todas as amostras passaram nos controlos de qualidade de ADN em ambos os métodos de extracção de ADN genómico.

A regressão de Deming comparou as percentagens medidas das mutações JAK2 de ambos os métodos. Houve uma forte correlação entre o método de referência e o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR para amostras com mutações JAK2 com níveis de mutação entre 0% e 95% ($R^2=0,969$), tal como mostra a Figura 4.

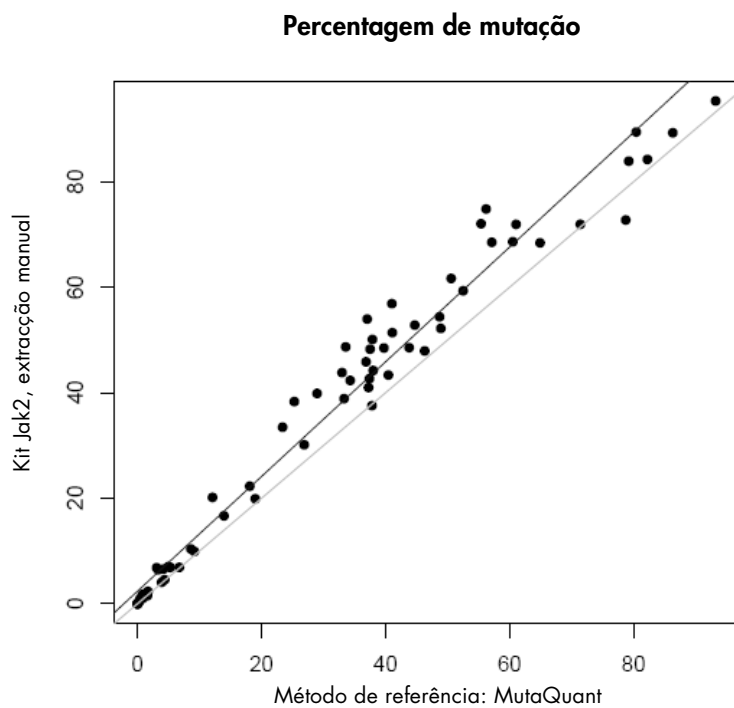


Figura 4. Gráfico de percentagens de mutação de JAK2 V617F obtidas com o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR e um método de referência sobre as mesmas amostras.

As percentagens de mutação de JAK2 obtidas com o kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR foram globalmente mais elevadas do que as percentagens obtidas com o método de referência, realçando a melhor sensibilidade deste novo kit (~ 1 registo) (9).

Bibliografia

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. Lippert E. et al. (2014) Clinical and biological characterization of patients with low (0.1-2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica*. **99**, e98.
9. 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.

Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer na embalagem e nas etiquetas:



Contém reagentes suficientes para <N> reacções



Prazo de validade



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*



Ref.º



Número de lote



Número do material



Global Trade Item Number



Limites de temperatura



Fabricante



Proteger da luz



Consultar instruções de utilização



Aviso

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support, ligue para 00800-22-44-6000 ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Informações para encomendar

Produto	Conteúdo	Ref.ª
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacções: controlo JAK2 de tipo selvagem, controlo JAK2 V617F, padrões quant. JAK2 WT, padrões quant. JAK2 MT, mistura da reacção JAK2 WT, mistura da reacção JAK2 MT, polimerase Taq de DNA, tampão TE para diluição, água para NTC	673623
Rotor-Gene Q MDx – para análise PCR em tempo real validada por IVD em aplicações clínicas		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de Fusão de Alta Resolução (HRM) com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e do serviço de assistência; instalação e formação não incluídos	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de Fusão de Alta Resolução (HRM) com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e do serviço de assistência; instalação e formação	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Software para testes de rotina juntamente com o Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Software com licença única para instalação num computador	9025620
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Bloco de alumínio para a preparação manual da reacção com uma pipeta de canal único em 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reacções	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10 000 reacções	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparações: Colunas de rotação, soluções tampão, reagentes, tubos, conectores de vácuo mini do QIAamp	61104
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit	Para 192 preparações de 200 µl cada: inclui 2 cartuchos de reagentes e racks e acessórios de enzimas	937236
QIAsymphony SP e acessórios		
QIAsymphony SP System	Módulo de preparação de amostras QIAsymphony: inclui instalação e formação e 1 ano de garantia das peças e do serviço de assistência	9001751
QIAsymphony SP	Módulo de preparação de amostras QIAsymphony: inclui 1 ano de garantia das peças e do serviço de assistência	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Cartuchos de preparação de amostras de 8 poços para serem utilizados juntamente com QIAsymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Tampas de 8 hastas para serem utilizadas juntamente com QIAsymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Pontas com filtros descartáveis com racks; (8 x 128). Para serem utilizadas juntamente com o QIAcube® e os equipamentos QIAsymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Pontas com filtros descartáveis com racks; (8 x 128). Para serem utilizadas juntamente com os equipamentos QIAsymphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Tubos de polipropileno não esterilizados (0,85 ml de capacidade máxima, menos de 0,7 ml de capacidade de armazenamento, 0,4 ml de capacidade de eluição); 2304 em racks de 96; inclui tiras de tampas	19588
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 unidades/ml, solução)	19101
Buffer ATL (200 ml)	Tampão de lise de tecido de 200 ml para 1000 preparações	19076

Para informações actualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respectivo manual de instruções do kit QIAGEN ou o manual do utilizador. Os guias e manuais do utilizador do kit QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Este produto destina-se à utilização em diagnóstico *in vitro*. Os produtos *ipsogen* não podem ser revendidos, modificados para revenda ou utilizados para o fabrico de produtos comerciais sem a aprovação por escrito da QIAGEN.

As informações contidas neste documento estão sujeitas a alterações sem aviso prévio. A QIAGEN não se responsabiliza por quaisquer erros que possam aparecer neste documento. Considera-se este documento como completo e rigoroso no momento da sua publicação. Em caso algum poderá a QIAGEN ser considerada como responsável por danos acidentais, especiais, múltiplos ou consequenciais relacionados com ou decorrentes da utilização deste documento.

Garantimos que os produtos *ipsogen* cumprem as especificações indicadas. Caso os produtos não apresentem o desempenho garantido, a única obrigação da QIAGEN e a única compensação do cliente limitam-se à substituição dos produtos de forma gratuita.

A mutação JAK2 V617F e suas utilizações são protegidas por direitos de patente, incluindo a patente europeia EP1692281, patentes dos EUA 7,429,456 e 7,781,199, pedidos de patentes dos EUA US20090162849 e US20120066776 e equivalentes estrangeiras.

A aquisição deste produto não implica qualquer direito à sua utilização em ensaios clínicos de medicamentos destinados a JAK2V617F. A QIAGEN desenvolve programas de licenciamento específico para essas utilizações. Contacte o nosso departamento jurídico através de jak2licenses@qiagen.com.

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony®, HotStarTaq®, *ipsogen*®, MutaQuant®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co).

Contrato de Licença Limitada

A utilização deste produto implica a aceitação por parte de qualquer comprador ou utilizador do kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR dos seguintes termos:

1. O kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR pode ser utilizado unicamente de acordo com o Manual do kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR (*ipsogen* JAK2 RGQ PCR *Kit Handbook*) e apenas para a utilização com os componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo descrito em contrário no Manual do kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR (*ipsogen* JAK2 RGQ PCR *Kit Handbook*) e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com.
2. Salvo em licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não presta qualquer garantia de que este Kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinja(m) os direitos de terceiros.
3. Este Kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados nem ser objecto de revenda.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do Kit concordam em não tomar medidas nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir ou proporcionar quaisquer dos actos proibidos acima mencionados. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao Kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença actualizados, consulte www.qiagen.com.
HB-1829-005 1107956 157038730 © 2017 QIAGEN, all rights reserved.

Encomendas www.qiagen.com/shop | Assistência técnica support.qiagen.com | Website www.qiagen.com