

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

 12 (n.º de referencia 673522)

 24 (n.º de referencia 673523)

Versión 1

IVD

Diagnóstico in vitro cuantitativo

Para utilizar con los instrumentos Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System y LightCycler[®].



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R3

MAT

1072501ES



QIAGEN: Sample and Assay Technologies

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas
- Investigación con microARN y ARNi
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para más información, visite **www.qiagen.com**.

Contenido

Uso previsto	4
Resumen y descripción	4
Principios del procedimiento	7
Materiales suministrados	11
Contenido del kit	11
Materiales necesarios pero no suministrados	12
Advertencias y precauciones	14
Precauciones generales	14
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	15
Procedimiento	16
Preparación del ADN de las muestras	16
Protocolos	
■ qPCR en un instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o RotorGene Q 5plex HRM con rotor para 72 tubos	17
■ qPCR en los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System y LightCycler 480	22
■ qPCR en el instrumento LightCycler 1.2	28
Interpretación de los resultados	33
Guía de resolución de problemas	37
Control de calidad	41
Limitaciones	41
Características del rendimiento	42
Estudios no clínicos	42
Estudios clínicos	43
Referencias bibliográficas	45
Símbolos	46
Información de contacto	46
Información para pedidos	47

Uso previsto

El kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* es un análisis cuantitativo in vitro destinado a la detección y la cuantificación del alelo V617F/G1849T del gen JAK2 en ADN genómico extraído de sangre periférica de sujetos con posible neoplasia mieloproliferativa (NMP).

La ausencia de la mutación V617F/G1849T del gen JAK2 no descarta la existencia de otras mutaciones de dicho gen. En el caso de que existan otras mutaciones en los nucleótidos 88.504 a 88.622, el análisis puede dar resultados negativos falsos (1).

Nota: El kit debe utilizarse siguiendo las instrucciones recogidas en este manual, junto con reactivos e instrumentos validados. Cualquier uso no autorizado de este producto o modificación de los componentes eximirá a QIAGEN de cualquier responsabilidad.

Resumen y descripción

En 2005 (2-5) se identificó una mutación somática recurrente, V617F, que afecta al gen de la tirosinquinasa Janus 2 (JAK2), lo cual dio lugar a un importante avance en la comprensión, la clasificación y el diagnóstico de las neoplasias mieloproliferativas (NMP). JAK2 es una molécula de señalización intracelular fundamental para diversas citocinas, incluida la eritropoyetina.

La mutación V617F del gen JAK2 se detecta en > 95% de los pacientes con policitemia vera (PV), en el 50-60% de los pacientes con trombocitemia esencial (TE) y en el 50% de los pacientes con mielofibrosis primaria (MFP). También se ha detectado la mutación V617F del gen JAK2 en algunos casos raros de leucemia mielomonocítica crónica, síndrome mielodisplásico, mastocitosis sistémica y leucemia neutrófila crónica, pero en el 0% de los casos de leucemia mieloide crónica (LMC) (6).

La mutación corresponde al cambio de un solo nucleótido en la posición 1849 del gen JAK2, en el exón 14, lo que provoca la sustitución aislada de una valina (V) por una fenilalanina (F) en la posición 617 de la proteína (dominio JH2). Da lugar a activación constitutiva del JAK2, transformación hematopoyética in vitro y crecimiento de colonias eritroides independientes de la eritropoyetina (CEE) en todos los pacientes con PV y en una gran proporción de los pacientes con TE y MFP (7). La mutación V617F del gen JAK2 representa un inductor esencial en la transformación de las células hematopoyéticas en las NMP, pero todavía no se han identificado completamente los mecanismos patológicos exactos que dan lugar, con la misma mutación aislada, a estas entidades clínicas y biológicas tan distintas.

Tradicionalmente, el diagnóstico de las NMP se basaba en criterios clínicos, criterios histológicos de la médula ósea y criterios citogenéticos. El descubrimiento de un marcador molecular específico de la enfermedad ha

simplificado el proceso y ha permitido mejorar la exactitud diagnóstica. La detección de la mutación V617F del gen JAK2 forma parte ahora de los criterios de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2008 para el diagnóstico de las NMP negativas para BCR-ABL (tabla 1), y la presencia de esta mutación es un criterio mayor para la confirmación del diagnóstico.

Tabla 1. Criterios de la OMS para el diagnóstico de las NMP (adaptado de la referencia 8).

Criterios para un diagnóstico de policitemia vera (PV)	
Mayores	<p>1. Hemoglobina (Hb) > 18,5 g·dl⁻¹ (hombres) o > 16,5 g·dl⁻¹ (mujeres), o Hb o hematocrito (Hct) > percentil 99 del intervalo de referencia para la edad, el sexo o la altitud de residencia, o Hb > 17 g·dl⁻¹ (hombres) o > 15 g·dl⁻¹ (mujeres) si se asocia a un aumento mantenido de ≥ 2 g·dl⁻¹ con respecto al valor basal que no puede atribuirse a la corrección de una ferropenia, o Elevación de la masa eritrocitaria > 25% por encima del valor previsto normal medio.</p> <p>2. Presencia de la mutación <i>JAK2V617F</i> o de una mutación similar.</p>
Menores	<p>1. Mieloproliferación de las tres líneas celulares de la médula ósea. 2. Nivel de eritropoyetina sérica inferior al intervalo normal. 3. Crecimiento de colonias eritroides endógenas (CEE).</p>
Criterios para un diagnóstico de trombocitemia esencial (TE)	
Mayores	<p>1. Recuento de plaquetas ≥ 450 x 10⁹ l⁻¹. 2. Proliferación de megacariocitos con morfología grande y madura. Proliferación granulocítica o eritroide ausente o escasa. 3. No se cumplen los criterios de la OMS para la leucemia mieloide crónica (LMC), la PV, la mielofibrosis primaria (MFP), los síndromes mielodisplásicos (SMD) u otras neoplasias mieloides.</p> <p>4. Demostración de la mutación <i>JAK2V617F</i> o de otro marcador clonal, o Ausencia de signos de trombocitosis reactiva.</p>
Menores	-
Criterios para un diagnóstico de mielofibrosis primaria (MFP)	
Mayores	<p>1. Proliferación megacariocítica y atipia acompañadas de fibrosis reticulínica y/o colágena, o En ausencia de fibrosis reticulínica, los cambios en los megacariocitos deben acompañarse de un aumento de la celularidad de la médula ósea, proliferación granulocítica y, a menudo, disminución de la eritropoyesis (es decir, MFP prefibrótica). 2. No se cumplen los criterios de la OMS para LMC, PV, SMD u otras neoplasias mieloides.</p> <p>3. Demostración de la mutación <i>JAK2V617F</i> o de otro marcador clonal, o Ausencia de signos de fibrosis medular reactiva.</p>

Criterios para un diagnóstico de mielofibrosis primaria (MFP)

- Menores
1. Leucoeritroblastosis.
 2. Elevación de la lactato-deshidrogenasa (LDH) sérica.
 3. Anemia.
 4. Esplenomegalia palpable.

Recientemente, expertos internacionales han propuesto criterios para los ensayos terapéuticos en la PV y la TE. Sobre la base de los datos relativos a aloinjertos, interferón alfa o hidroxiurea, se ha incorporado la cuantificación de la mutación JAK2V617F como herramienta potencialmente útil para controlar la respuesta al tratamiento (9). Se ha observado una disminución de la carga de la mutación V617F del gen JAK2 en respuesta a algunos fármacos nuevos dirigidos contra la JAK2 en fase de desarrollo clínico (10).

Principios del procedimiento

Se han propuesto varias técnicas diferentes para determinar cuantitativamente la proporción de polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) en muestras de ADN. De ellos, se prefieren los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) en tiempo real porque su mayor sensibilidad permite controlar la carga alélica de manera longitudinal. Muchas de estas técnicas tienen una sensibilidad moderada del 1-10%, por ejemplo, la discriminación alélica TaqMan[®], la tecnología Pyrosequencing[®] (pirosecuenciación), el análisis de curvas de disociación y la secuenciación directa. Algunos de ellos, como el análisis de curvas de disociación y la secuenciación, son únicamente semicuantitativos, mientras que otros, como la pirosecuenciación, precisan un procesamiento posterior a la PCR o requieren instrumentos no disponibles para todos o que tienen costes de preparación prohibitivos para análisis de laboratorio sistemáticos. Un método muy sensible con una sensibilidad < 0,1% requiere el uso de un primer específico del SNP que permita la amplificación selectiva del alelo mutante o nativo que es fácilmente detectable en un instrumento de qPCR en tiempo real. El kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* se basa en esta técnica.

El uso de la qPCR permite la cuantificación exacta de los productos de la PCR durante la fase exponencial del proceso de amplificación con PCR. Es posible obtener rápidamente datos de la PCR cuantitativa sin necesidad de un procesamiento posterior a la PCR mediante la detección en tiempo real de señales fluorescentes durante los ciclos de PCR y después de estos, reduciendo así considerablemente el riesgo de contaminación con productos de la PCR. Actualmente se dispone de 3 tipos principales de técnicas de qPCR: análisis de

qPCR con colorante SYBR® Green I, análisis de qPCR con sondas de hidrólisis y análisis de qPCR con sondas de hibridación.

Este ensayo aprovecha el principio de la hidrólisis de oligonucleótidos con doble colorante para qPCR. Durante la PCR, primers directos e inversos se hibridan con una secuencia específica. La misma mezcla contiene un oligonucleótido con doble colorante. Esta sonda, que consta de un oligonucleótido marcado con un colorante indicador en el extremo 5' y un colorante extintor de fluorescencia en el extremo 3', se hibrida con una secuencia diana dentro del producto de la PCR. El análisis de qPCR con sondas de hidrólisis aprovecha la actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN-polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq). Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante indicador al colorante extintor de fluorescencia provoca la supresión de la fluorescencia del indicador principalmente por transferencia de energía de tipo Förster.

Durante la PCR, si la diana que nos interesa está presente, la sonda hibrida específicamente entre el primer directo y el inverso. La actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN-polimerasa escinde la sonda entre el indicador y el extintor de fluorescencia únicamente si la sonda se hibrida con la diana. A continuación, los fragmentos de la sonda se separan de la diana y continúa la polimerización de la cadena. Se bloquea el extremo 3' de la sonda para impedir la extensión de la sonda durante la PCR (figura 1). Este proceso ocurre en todos los ciclos y no interfiere en la acumulación exponencial del producto.

El aumento de la señal de fluorescencia se detecta únicamente si la secuencia diana es complementaria a la sonda y, por consiguiente, se amplifica durante la PCR. Debido a estos requisitos, no se detecta una amplificación inespecífica. Por tanto, el aumento de la fluorescencia es directamente proporcional a la amplificación de la diana durante la PCR.

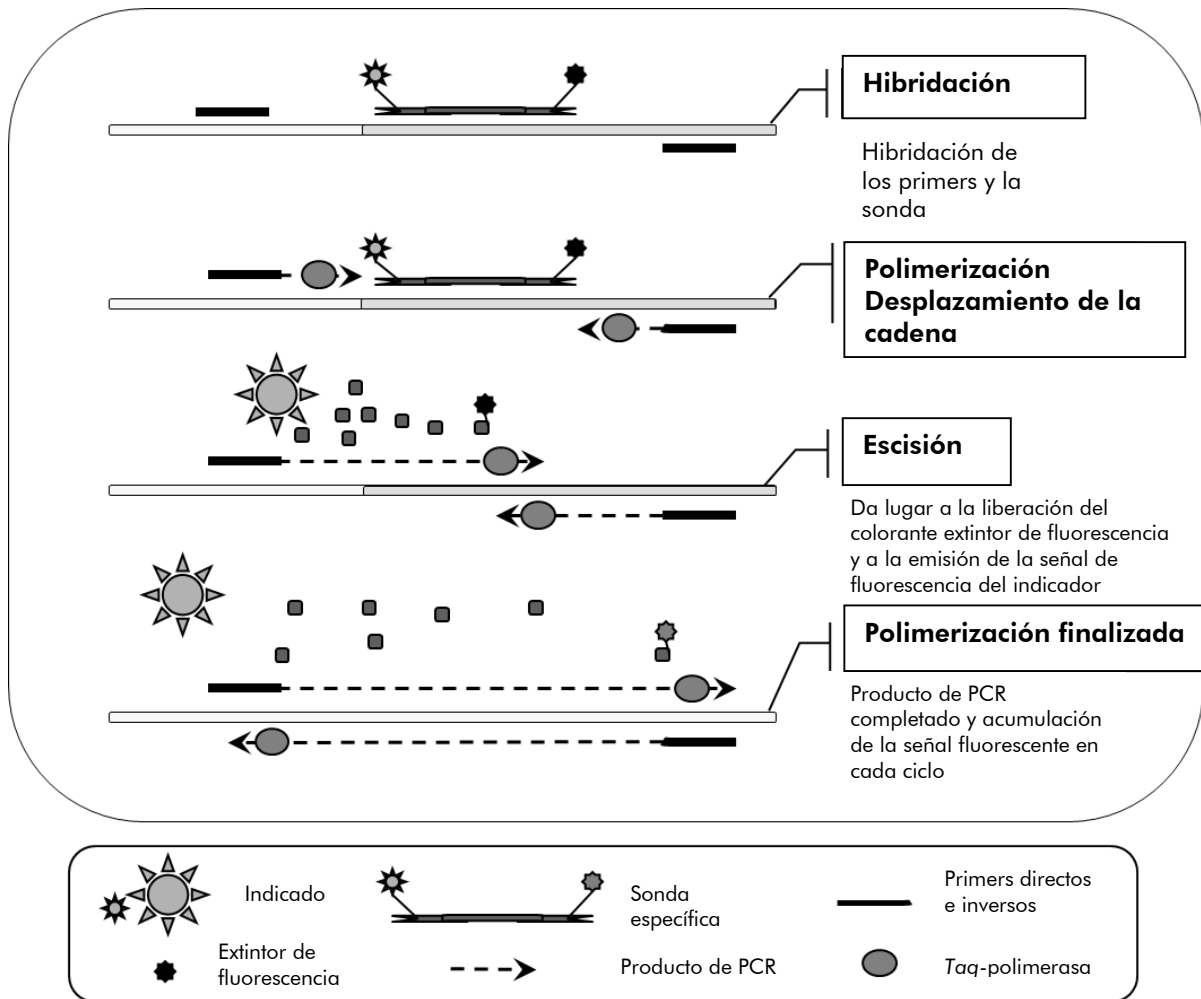


Figura 1. Principio de la reacción.

La tecnología de PCR cuantitativa específica del alelo empleada en este kit de ensayo permite una detección sensible, precisa y muy reproducible de los SNP. Esta técnica se basa en el empleo de primers directos específicos para el alelo nativo (*wild-type*, WT) y para el alelo V617F (11). En la PCR únicamente la concordancia perfecta entre el primer y el ADN diana permite la extensión y la amplificación (véase la figura 2).

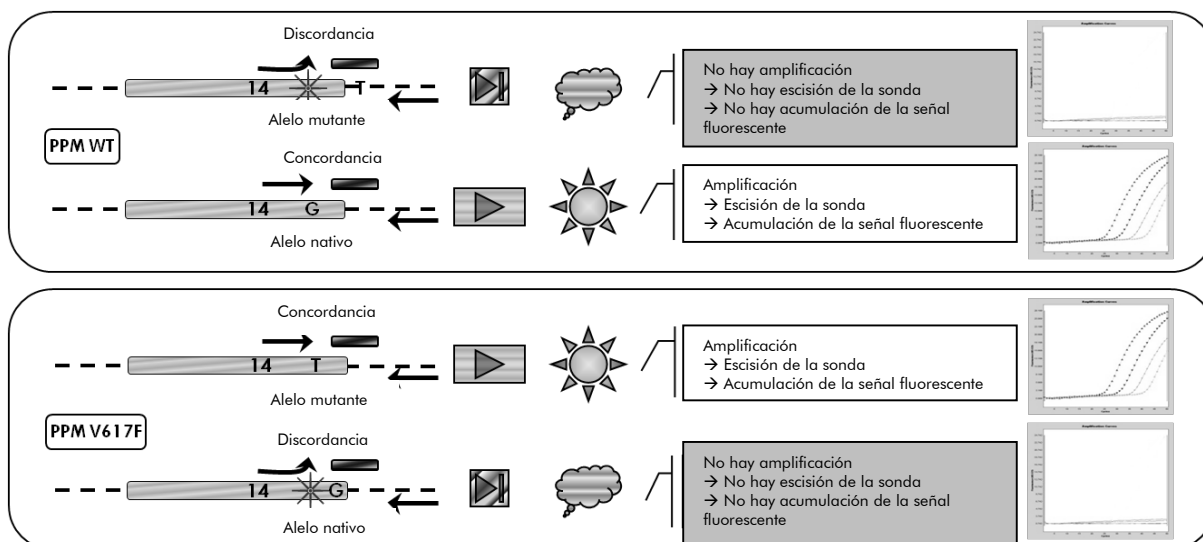


Figura 2. PCR específica del alelo. El empleo de la mezcla de primers y sonda para el alelo nativo o para el alelo V617F permite la detección específica del alelo nativo o mutante en dos reacciones distintas realizadas con la misma muestra. Los resultados pueden expresarse como porcentaje de copias del alelo mutante (VF) respecto del total de copias de JAK2.

Materiales suministrados

Contenido del kit

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
N.º de referencia		673522	673523
Número de reacciones		12	24
V617F positive control (control positivo de V617F) (100% de alelo V617F)	PC-VF JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (control negativo de V617F) (100% de alelo nativo)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution (dilución patrón M1-VF), 50 copias (5 x 10 ¹ copias de V617F/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution (dilución patrón M2-VF), 500 copias (5 x 10 ² copias de V617F/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution (dilución patrón M3-VF), 5.000 copias (5 x 10 ³ copias de V617F/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution (dilución patrón M4-VF), 50.000 copias (5 x 10 ⁴ copias de V617F/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution (dilución patrón WT-2), 50 copias (5 x 10 ¹ copias del alelo nativo/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution (dilución patrón WT-2), 500 copias (5 x 10 ² copias del alelo nativo/5 µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl
WT-3 Standard Dilution (dilución patrón WT-4), 5000 copias (5 x 10 ³ copias del alelo nativo/5 µl)	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution (dilución patrón WT-4), 50.000 copias (5 x 10 ⁴ copias del alelo nativo/5 µl)	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
N.º de referencia		673522	673523
Número de reacciones		12	24
Primers and Probe Mix JAK2 WT* (mezcla de primers y sonda para el alelo nativo del gen JAK2)	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F† (mezcla de primers y sonda para la mutación V617F del gen JAK2)	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
ipsogen JAK2 MutaQuant Kit Handbook (inglés)		1	1

* Mezcla de primers inversos y directos específicos para el gen de control JAK2 nativo y una sonda FAM™-TAMRA™ específica.

† Mezcla de primers inversos y directos específicos para la mutación V617F del gen JAK2 y una sonda FAM-TAMRA específica.

Nota: Mezclar en vórtex y centrifugar las diluciones patrón y las mezclas de primers y sonda antes de su empleo.

Materiales necesarios pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS, safety data sheets) correspondientes, que podrá solicitar al proveedor del producto.

Reactivos

- Agua libre de nucleasas apta para PCR
- Tampón y ADN-polimerasa *Taq*: los reactivos validados son TaqMan Universal PCR Master Mix (mezcla maestra para PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific), n.º de referencia 4304437) y LightCycler TaqMan Master (mezcla maestra para PCR 5x) (Roche, n.º de referencia 04535286001) o LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe® (mezcla maestra 5x) (Roche, n.º de referencia 03515567001)

Consumibles

- Puntas de pipeta para PCR estériles, libres de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros hidrófobos
- Tubos para PCR libres de nucleasas de 0,5 ml o 1,5 ml

- Hielo

Equipo

- Pipeta graduada en microlitros* dedicada exclusivamente para PCR (1-10 μ l; 10-100 μ l; 100-1.000 μ l)
- Centrifugadora de mesa* con rotor para tubos de reacción de 0,5 ml/1,5 ml y microplacas (con capacidad para centrifugar a 13.000-14.000 rpm)
- Instrumento de PCR en tiempo real*: Rotor-Gene Q 5plex HRM[®] u otro instrumento Rotor-Gene; LightCycler 1.2, o 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; y material específico asociado
- Biofotómetro

* Asegúrese de que los instrumentos hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico in vitro

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las correspondientes hojas de datos de seguridad (SDS). Dichas hojas están disponibles en internet en un formato PDF cómodo y compacto en www.qiagen.com/safety, donde podrá encontrar, ver e imprimir la hoja de datos de seguridad correspondiente a cada kit y a cada componente del kit de QIAGEN.

Elimine los desechos de las muestras y del ensayo de conformidad con la normativa local sobre seguridad.

Precauciones generales

El uso de análisis de qPCR exige la adopción de buenas prácticas de laboratorio, incluidas las relativas al mantenimiento del equipo, que sean específicas para laboratorios de biología molecular y que cumplan los reglamentos vigentes y las normas aplicables.

Este kit está indicado para uso diagnóstico in vitro. Los reactivos y las instrucciones suministrados con este kit han sido validados para ofrecer un rendimiento óptimo. La dilución excesiva de los reactivos o un cambio en los tiempos y las temperaturas de incubación pueden causar resultados erróneos o dispares. Los reactivos PPM-WT y PPM-VF podrían alterarse si se exponen a la luz. Todos los reactivos están formulados de manera específica para su utilización en este análisis. No deben sustituirse si se desea obtener un resultado óptimo del análisis.

Tenga la máxima precaución para evitar:

- Contaminación con desoxirribonucleasa, que podría degradar el molde de ADN.
- Contaminación por arrastre del ADN o de los productos de la PCR, que podría producir señales positivas falsas.

Por lo tanto, recomendamos lo siguiente:

- Utilizar material de laboratorio (como pipetas, puntas de pipeta, tubos de reacción) libre de nucleasas y llevar guantes cuando se realice el ensayo.
- Usar puntas de pipeta resistentes a los aerosoles nuevas en todos los pasos del pipeteo para evitar la contaminación cruzada entre las muestras y los reactivos.
- Preparar la premezcla maestra para PCR con material específico (pipetas, puntas, etc.) en una zona dedicada exclusivamente a tal fin donde no se introduzcan matrices de ADN (ADN, plásmidos o productos de PCR).

Añadir el molde en una zona aparte (preferiblemente en una sala independiente) con material específico (pipetas, puntas, etc.).

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Los kits se envían en nieve carbónica y deben conservarse entre -15 °C y -30 °C tras su recepción.

- Reducir al mínimo la exposición a la luz de las mezclas de primers y sonda (tubos de PPM-WT y PPM-VF).
- Mezclar suavemente y centrifugar los tubos antes de abrirlos.
- Guardar todos los componentes del kit en los envases originales.

Estas condiciones de almacenamiento se aplican a los componentes abiertos y a los no abiertos. El incumplimiento de las condiciones de almacenamiento de los componentes que aparecen indicadas en las etiquetas podría afectar negativamente a los resultados del ensayo.

La fecha de caducidad de cada reactivo figura en las etiquetas de cada componente. El producto mantendrá su rendimiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta si se respetan las condiciones de almacenamiento correctas.

No hay señales obvias que indiquen inestabilidad de este producto. No obstante, deben realizarse simultáneamente controles positivos y negativos con especímenes desconocidos.

Procedimiento

Preparación del ADN de las muestras

El ADN genómico debe proceder de sangre completa, linfocitos de sangre periférica completa purificados, células polimorfonucleares o granulocitos. Para obtener resultados comparables se recomienda utilizar la misma fracción celular y el mismo método de extracción de ADN. La extracción del ADN puede realizarse utilizando un método propio o un kit comercial.

La cantidad de ADN debe determinarse midiendo la densidad óptica (*optical density*, OD) de la muestra a 260 nm, y la calidad del ADN puede determinarse mediante espectrofotometría o mediante electroforesis en gel*.

- El cociente OD_{260}/OD_{280} debe ser de 1,7-1,9, y cocientes inferiores a este intervalo podrían indicar una contaminación proteínica o la presencia de sustancias químicas orgánicas.
- El análisis electroforético en un gel de agarosa* al 0,8-1,0% debe permitir visualizar el ADN aislado como una banda nítida de unas 20 kb (una pequeña mancha dará resultados aceptables).

El ADN resultante debe diluirse hasta una concentración de 5 ng/ μ l en tampón* TE 1x a pH 8,0 y, a continuación, almacenarse entre +4 °C y +8 °C durante una semana o a -20 °C si se requiere un período de conservación más largo.

La reacción de qPCR está optimizada para muestras de ADN que contienen 25 ng de ADN genómico purificado.

* Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS, *safety data sheets*) correspondientes, que podrá solicitar al proveedor del producto.

Protocolo: qPCR en un instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o RotorGene Q 5plex HRM con rotor para 72 tubos

Si se emplea este instrumento, recomendamos realizar todas las mediciones por duplicado, como se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Número de reacciones para los instrumentos Rotor-Gene Q con rotor para 72 tubos.

Muestras	Reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo V617F del gen JAK2 (PPM-VF)	
4 patrones M-VF	8 reacciones, cada uno analizado por duplicado
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
2 controles de ADN	4 reacciones: control positivo (PC-VF) y control negativo (NC-VF), cada uno analizado por duplicado
Control de agua	2 reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo nativo del gen JAK2 (PPM-WT)	
4 patrones del alelo nativo	8 reacciones, cada uno analizado por duplicado
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
2 controles de ADN	4 reacciones: PC-VF y NC-VF, cada uno analizado por duplicado
Control de agua	2 reacciones

Procesamiento de las muestras en instrumentos Rotor-Gene Q con rotor para 72 tubos

Recomendamos analizar al menos 8 muestras de ADN con el kit de 24 reacciones (n.º de referencia 673523) y al menos 6 muestras de ADN con el kit de 12 reacciones (n.º de referencia 673522) en el mismo experimento con el fin de optimizar el empleo de los patrones y de las mezclas de primers y sonda.

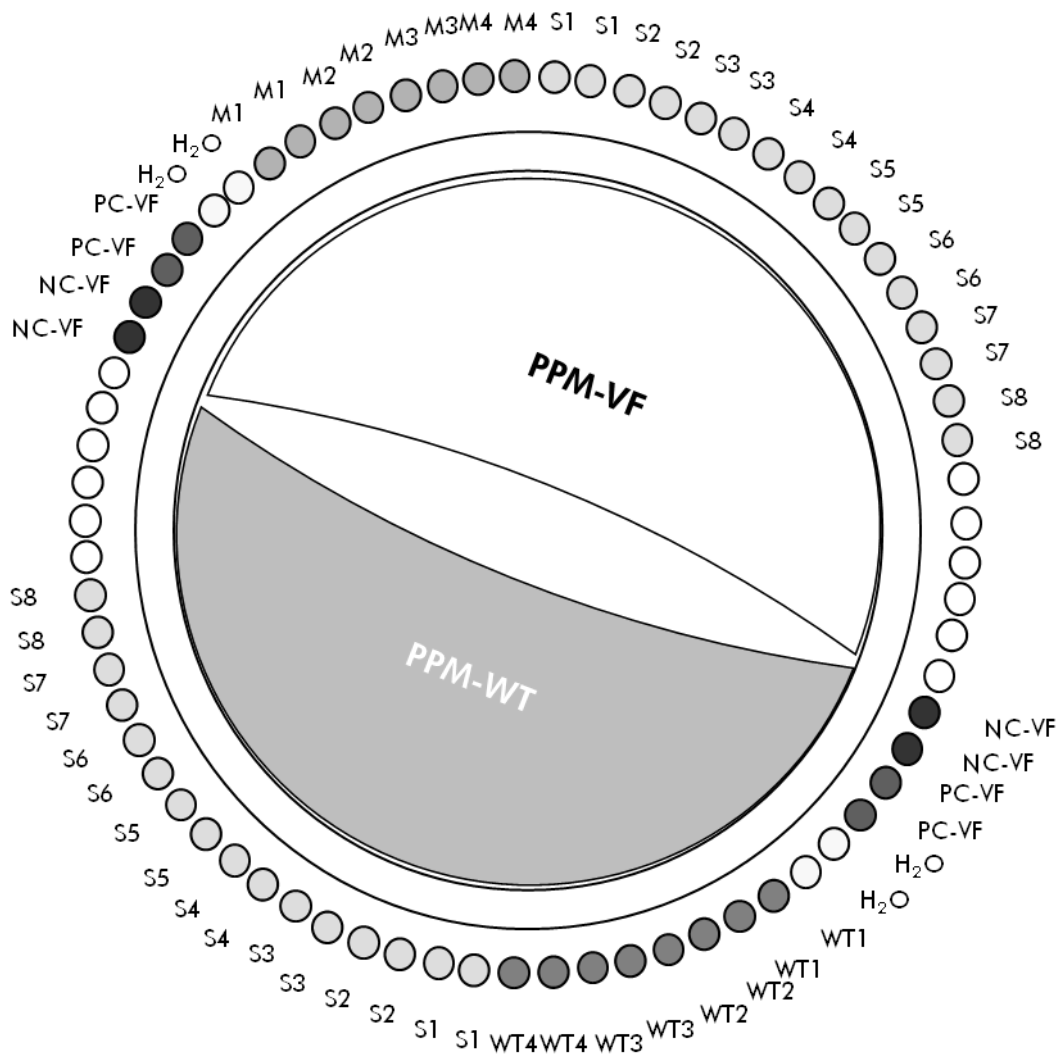


Figura 3. Disposición recomendada del rotor para cada experimento con el kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* para 24 muestras. PC-VF: control positivo de V617F; **NC-VF:** control negativo de V617F; **M-VF:** patrones de V617F; **M-WT:** patrones del alelo nativo; **S:** muestra de ADN; **H₂O:** control de agua.

Nota: Asegúrese de colocar siempre una muestra de análisis en la posición 1 del rotor. De lo contrario, el instrumento no se calibrará durante la fase de calibración y se obtendrán datos de fluorescencia incorrectos.

Colocar tubos vacíos en todas las demás posiciones.

qPCR en instrumentos Rotor-Gene Q con rotor para 72 tubos

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

Procedimiento

1. **Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
2. **Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.**

Todas las concentraciones se refieren al volumen final de la reacción.

En las tablas 3 y 4 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculada para lograr un volumen de reacción final de 25 μ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda (PPM-VF o PPM-WT). Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 3. Preparación de la mezcla de qPCR

Componente	1 reacción (μl)	Premezcla de V617F 30 + 1 reacciones (μl)	Concentración final
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Mezcla de primers y sonda, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6,5	201,5	–
Muestra (se añadirá en el paso 4)	5,0	5 para cada una	–
Volumen total	25,0	25 para cada una	–

Tabla 4. Preparación de la mezcla de qPCR

Componente	1 reacción (μl)	Premezcla WT 30 + 1 reacciones (μl)	Concentración final
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Mezcla de primers y sonda, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6,5	201,5	–
Muestra (se añadirá en el paso 4)	5,0	5 para cada una	–
Volumen total	25,0	25 para cada una	–

- 3. Poner 20 μ l de la premezcla de qPCR (VF o WT) por tubo.**
- 4. Agregar 5 μ l del material que debe cuantificarse (25 ng de ADN genómico de muestra o control) en el tubo correspondiente (volumen total, 25 μ l).**
- 5. Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.**
- 6. Colocar los tubos en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante.**
- 7. Programar el instrumento Rotor-Gene Q con el programa de termociclado según se indica en la tabla 5.**

Tabla 5. Perfil de temperatura.

Modo de análisis	Cuantificación
Espera 1	Temperatura: 50 °C Tiempo: 2 min
Espera 2	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 min
Ciclo	50 veces 95 °C durante 15 s 62 °C durante 1 min con adquisición de fluorescencia FAM en el canal Green: Single

- 8. Para instrumentos Rotor-Gene Q, seleccionar "Slope Correct" (corrección de pendiente) para el análisis. Recomendamos fijar el umbral en 0,03. Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 5.**

Protocolo: qPCR en los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System y LightCycler 480

Si se emplea un equipo de qPCR con placa de 96 pocillos, recomendamos realizar todas las mediciones por duplicado, como se indica en la tabla 6.

Tabla 6. Número de reacciones empleando un equipo de qPCR con placa de 96 pocillos.

Muestras	Reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo V617F del gen JAK2 (PPM-VF)	
4 patrones M-VF	8 reacciones, cada uno analizado por duplicado
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
2 controles de ADN	4 reacciones: PC-VF y NC-VF, cada uno analizado por duplicado
Control de agua	2 reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo nativo del gen JAK2 (PPM-WT)	
4 patrones del alelo nativo	8 reacciones, cada uno analizado por duplicado
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
2 controles de ADN	4 reacciones: PC-VF y NC-VF, cada uno analizado por duplicado
Control de agua	2 reacciones

Procesamiento de las muestras en los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System y LightCycler 480

Recomendamos analizar 8 muestras de ADN con el kit de 24 reacciones (n.º de referencia 673523) y al menos 6 muestras de ADN con el kit de 12 reacciones (n.º de referencia 673522) en el mismo experimento con el fin de optimizar el empleo de los patrones y de las mezclas de primers y sonda.

El esquema de la placa representado en la figura 4 muestra un ejemplo de este experimento con el kit para 24 reacciones (n.º de referencia 673523), y la

figura 5 muestra un ejemplo de este tipo de experimento con el kit para 12 reacciones (n.º de referencia 673522).

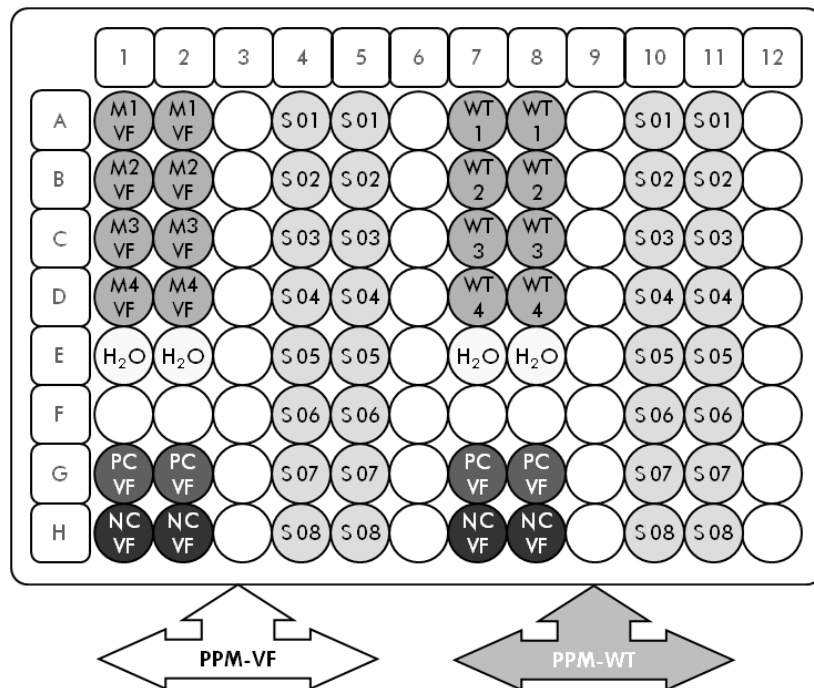


Figura 4. Disposición recomendada de la placa para un experimento con el kit para 24 reacciones (n.º de referencia 673523). PC-VF: control positivo de V617F; NC-VF: control negativo de V617F; M-VF: patrones de V617F; M-WT: patrones del alelo nativo; S: muestra de ADN; H₂O: control de agua.

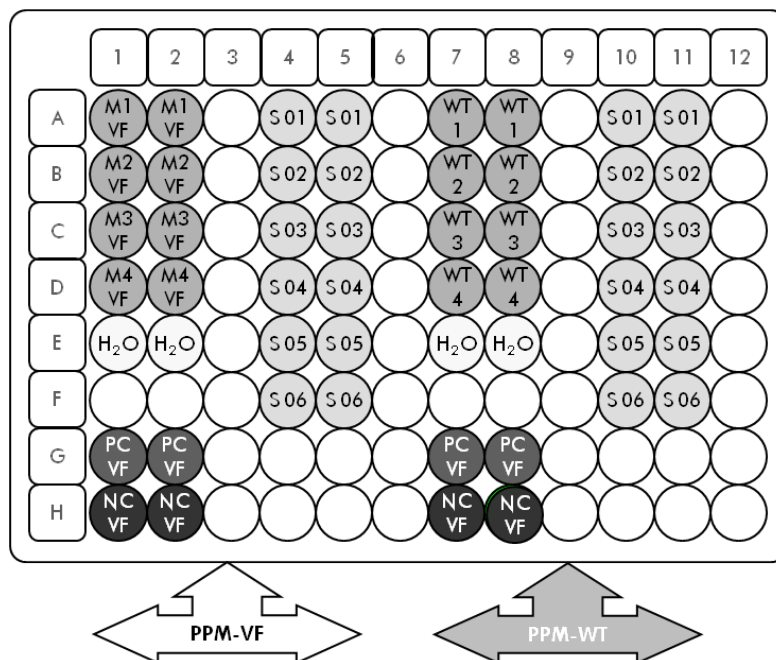


Figura 5. Disposición recomendada de la placa para un experimento con el kit para 12 reacciones (n.º de referencia 673522). PC-VF: control positivo de V617F; NC-VF: control negativo de V617F; M-VF: patrones de V617F; M-WT: patrones del alelo nativo; S: muestra de ADN; H₂O: control de agua.

qPCR en los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System y LightCycler 480

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

Procedimiento

1. **Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
2. **Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.**

Todas las concentraciones se refieren al volumen final de la reacción.

En las tablas 7 y 8 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculada para lograr un volumen de reacción final de 25 μ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda (PPM-VF o PPM-WT). Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 7. Preparación de la mezcla de qPCR.

Componente	Premezcla de V617F			Concentración final
	1 reacción (μ l)	26 + 1 reacciones (μ l)	30 + 1 reacciones (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Mezcla de primers y sonda, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6,5	175,5	201,5	–
Muestra (se añadirá en el paso 4)	5,0	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	25,0	25 para cada una	25 para cada una	–

Tabla 8. Preparación de la mezcla de qPCR

Componente	Premezcla WT			Concentración final
	1 reacción (μl)	26 + 1 reacciones (μl)	30 + 1 reacciones (μl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Mezcla de primers y sonda, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6,5	175,5	201,5	–
Muestra (se añadirá en el paso 4)	5,0	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	25,0	25 para cada una	25 para cada una	–

3. Poner 20 μl de la premezcla de qPCR (VF o WT) por pocillo.
4. Agregar 5 μl del material que debe cuantificarse (25 ng de ADN genómico de muestra o control) en el pocillo correspondiente (volumen total, 25 μl).
5. Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.
6. Cerrar la placa y centrifugar brevemente (300 x g durante aproximadamente 10 segundos).
7. Colocar la placa en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante.
8. Programar el termociclador con el programa de termociclado y configurar el instrumento para la adquisición de la sonda fluorescente FAM de doble marcaje según se indica en la tabla 9 para los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS y Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System o en la tabla 10 para el instrumento LightCycler 480.

Tabla 9. Perfil de temperatura para los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS y Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Modo de análisis	Curva patrón – Cuantificación absoluta
Espera 1	Temperatura: 50 °C Tiempo: 2 minutos
Espera 2	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 minutos
Ciclo	50 veces 95 °C durante 15 s 63 °C durante 1 minuto y 30 segundos con adquisición de fluorescencia FAM; extintor de fluorescencia: TAMRA

Tabla 10. Perfil de temperatura para el instrumento LightCycler 480

Modo de análisis	Cuantificación absoluta (“Abs Quant”)
Formatos de detección	Seleccionar “Simple Probe” (sonda simple) en la ventana “Detection formats”
Espera 1	Temperatura: 50 °C Tiempo: 2 minutos
Espera 2	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 minutos
Ciclo	50 veces 95 °C durante 15 s 63 °C durante 1 minuto y 30 segundos con adquisición de fluorescencia FAM correspondiente a (483-533 nm) para LC versión 01 y (465-510 nm) para LC versión 02.

- 9. Para los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS y Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, seguir el paso 9a. Para el instrumento LightCycler 480, seguir el paso 9b.**

- 9a. Instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS y Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: recomendamos fijar el umbral en 0,1. Iniciar el programa de ciclado según se indica en la tabla 9.**
- 9b. LightCycler 480: recomendamos el modo "Fit point analysis" (análisis del punto de ajuste) con fondo en 2,0 y umbral en 2,0. Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 10.**

Protocolo: qPCR en el instrumento LightCycler 1.2

Si se emplean instrumentos para capilares, recomendamos medir las muestras por duplicado y los controles una sola vez, según se indica en la tabla 11.

Tabla 11. Número de reacciones para el instrumento LightCycler 1.2.

Muestras	Reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo V617F del gen JAK2 (PPM-VF)	
4 patrones M-VF	4 reacciones, cada uno analizado una vez
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
2 controles de ADN	2 reacciones: PC-VF y NC-VF, cada uno analizado una vez
Control de agua	1 reacción
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo nativo del gen JAK2 (PPM-WT)	
4 patrones del alelo nativo	4 reacciones, cada uno analizado una vez
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
2 controles de ADN	2 reacciones: PC-VF y NC-VF, cada uno analizado una vez
Control de agua	1 reacción

Procesamiento de las muestras en el instrumento LightCycler 1.2

Recomendamos analizar 4 muestras de ADN en el mismo experimento con el fin de optimizar el empleo de los patrones y de las mezclas de primers y sonda. El esquema de capilares representado en la figura 6 muestra un ejemplo de un experimento.

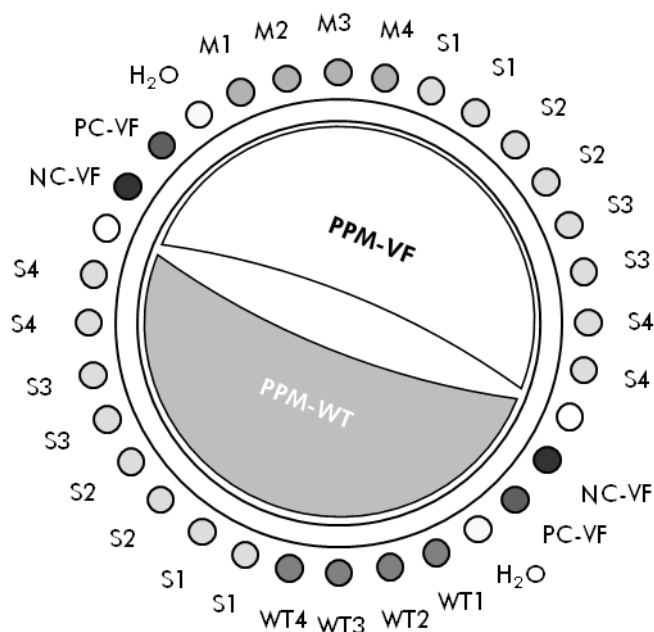


Figura 6. Disposición recomendada del rotor para cada experimento con el kit *ipsogen JAK2 MutaQuant*. PC-VF: control positivo de V617F; NC-VF: control negativo de V617F; M-VF: patrones de V617F; M-WT: patrones del alelo nativo; S: muestra de ADN; H₂O: control de agua.

qPCR en el instrumento LightCycler 1.2

Nota: Debido a requisitos tecnológicos particulares, los experimentos con LightCycler tienen que realizarse con reactivos específicos. Recomendamos emplear el reactivo LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe y seguir las instrucciones del fabricante para preparar la mezcla maestra 5x.

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

Procedimiento

1. **Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
2. **Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.**

Todas las concentraciones se refieren al volumen final de la reacción.

En las tablas 12 y 13 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculada para lograr un volumen de reacción final de 20 μ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda (PPM-VF o PPM-WT). Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 12. Preparación de la mezcla de qPCR

Componente	1 reacción (μl)	Premezcla de V617F 15 + 1 reacciones (μl)	Concentración final
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix recién preparado, 5x	4,0	64,0	1x
Mezcla de primers y sonda, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	10,2	163,2	–
Muestra (se añadirá en el paso 4)	5,0	5 para cada una	–
Volumen total	20,0	20 para cada una	–

Tabla 13. Preparación de la mezcla de qPCR.

Componente	1 reacción (μl)	Premezcla WT 15 + 1 reacciones (μl)	Concentración final
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix recién preparado, 5x	4,0	64,0	1x
Mezcla de primers y sonda, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	10,2	163,2	–
Muestra (se añadirá en el paso 4)	5,0	5 para cada una	–
Volumen total	20,0	20 para cada una	–

- 3. Poner 15 μ l de la premezcla de qPCR (VF o WT) por capilar.**
- 4. Agregar 5 μ l del material que debe cuantificarse (25 ng de ADN genómico de muestra o control) en el tubo correspondiente (volumen total, 20 μ l).**
- 5. Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.**
- 6. Colocar los capilares en los adaptadores suministrados con el aparato y centrifugar brevemente (700 x g, durante aproximadamente 10 segundos).**
- 7. Colocar los capilares en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante.**
- 8. Programar el instrumento LightCycler 1.2 con el programa de termociclado según se indica en la tabla 14.**

Tabla 14. Perfil de temperatura.

Modo de análisis	Cuantificación
Espera 1	Temperatura: 55 °C Tiempo: 2 minutos Rampa: 20
Espera 2	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 minutos Rampa: 20
Ciclo	50 veces 95 °C durante 15 s; rampa: 20 66 °C durante 1 min; rampa: 20; con adquisición de fluorescencia FAM: Single

9. Para el instrumento LightCycler 1.2 se recomienda el modo F1/F2 y "2nd derivative analysis" (segundo análisis derivativo). Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 14.

Interpretación de los resultados

Principio de análisis de los datos

Los datos para los valores del ciclo umbral (C_T , *threshold cycle*) y del punto de corte (C_P , *crossing point*) pueden exportarse desde el instrumento de qPCR y pegarse en un archivo de Excel® para su análisis. Estos valores pueden emplearse posteriormente para calcular el valor medio de C_P y C_T , y los valores medios de C_T de los patrones pueden representarse en una gráfica para obtener una curva patrón para los patrones del alelo nativo y de V617F por medio de la siguiente ecuación y de la tabla 15.

$y = C_P$ medio; $x = \log_{10} CN$, donde CN = número de copias (*copy number*) del gen en la muestra de $5 \mu l$

Tabla 15. Datos cuantitativos para los patrones del alelo nativo y de V617F

Patrón	Número de copias (CN)	$\log_{10} CN$
M1-VF	5×10^1 VF	1,7
M2-VF	5×10^2 VF	2,7
M3-VF	5×10^3 VF	3,7
M4-VF	5×10^4 VF	4,7
WT-1	5×10^1 WT	1,7
WT-2	5×10^2 WT	2,7
WT-3	5×10^3 WT	3,7
WT-4	5×10^4 WT	4,7

Nota: Cada usuario debe determinar su propia reproducibilidad en su laboratorio.

Curva patrón y criterios de calidad

Las figuras 7 y 9 muestran ejemplos de los resultados obtenidos con el kit *ipsogen JAK2 MutaQuant*, y las figuras 8 y 10 muestran un ejemplo de la curva teórica calculada con 4 diluciones patrón.

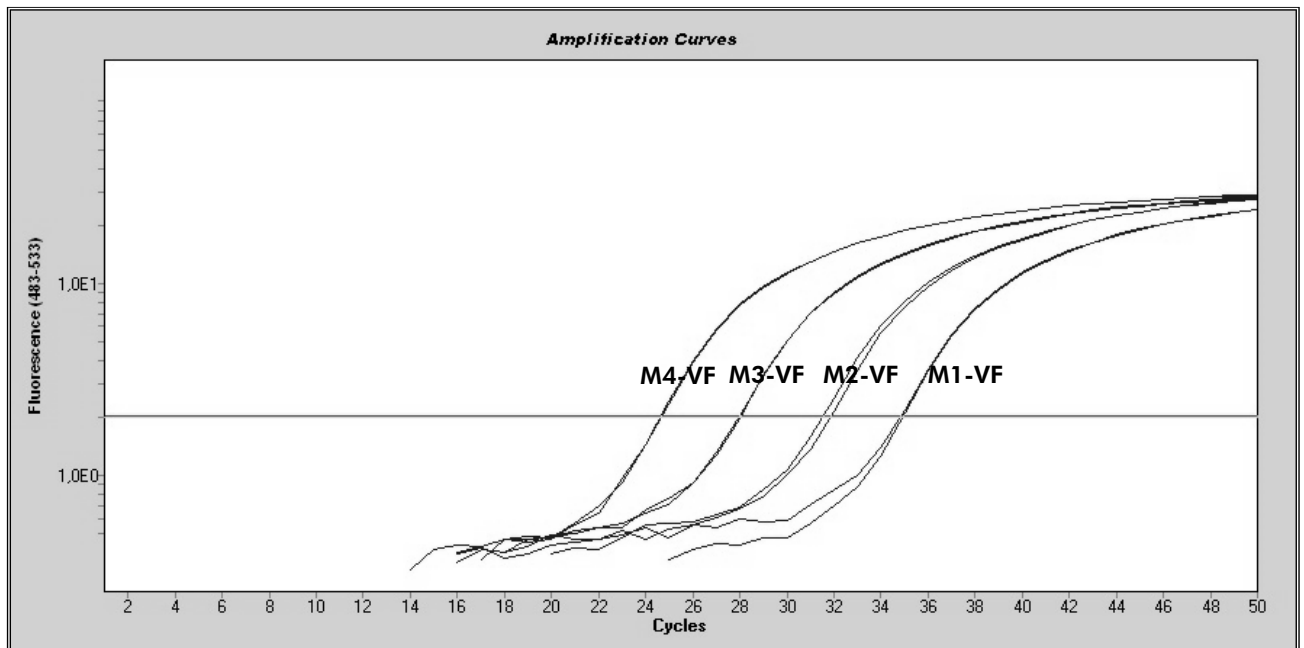


Figura 7. Gráfico de amplificación de 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 y 5×10^4 copias del plásmido V617F del gen JAK2 (controles M1-VF, M2-VF, M3-VF y M4-VF, respectivamente).

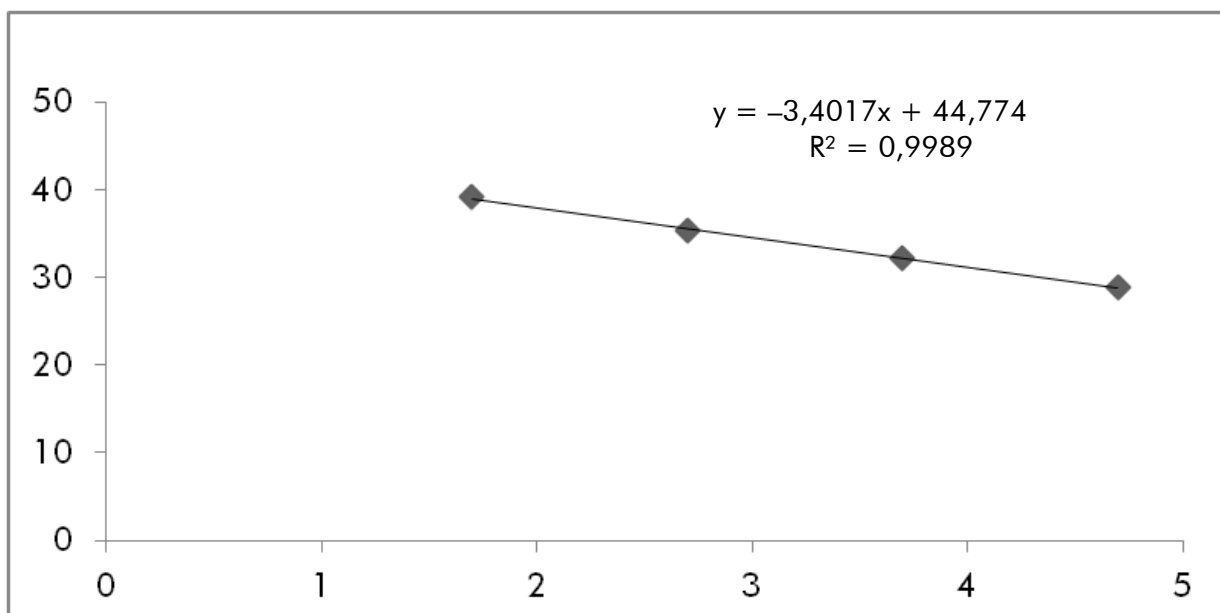


Figura 8. Curva patrón para el alelo V617F del gen JAK2.

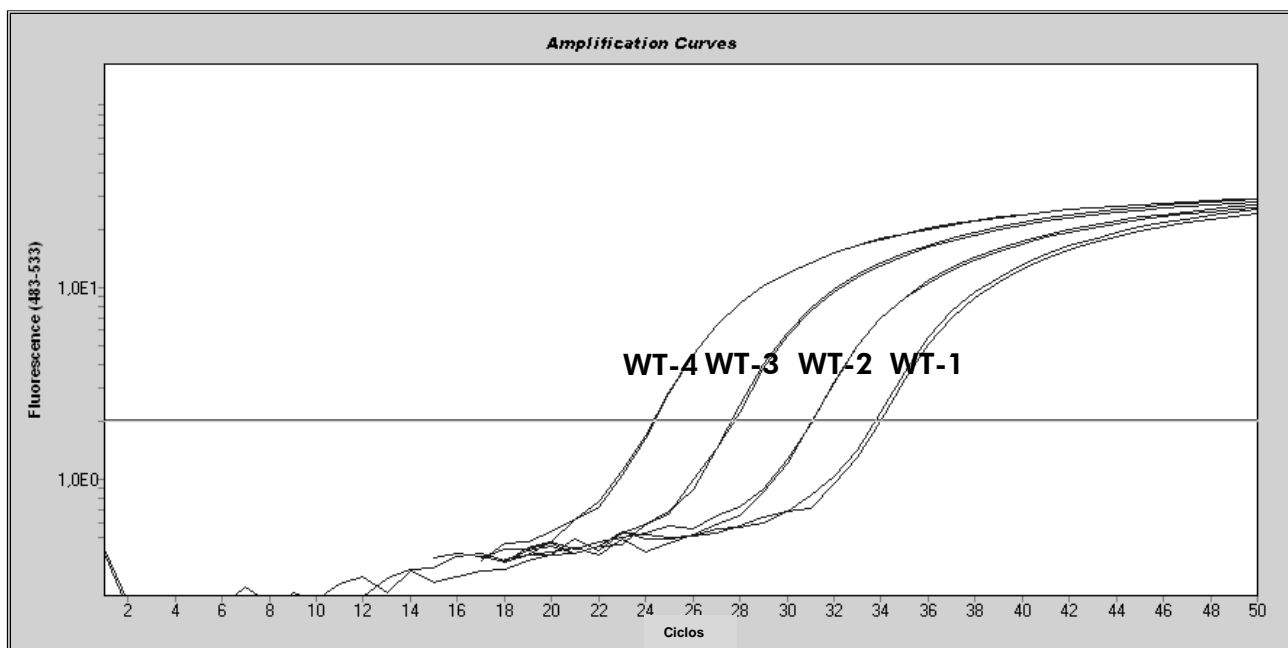


Figura 9. Gráfico de amplificación de 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 y 5×10^4 copias del plásmido nativo del gen JAK2 (controles WT-1, WT-2, WT-3 y WT-4, respectivamente).

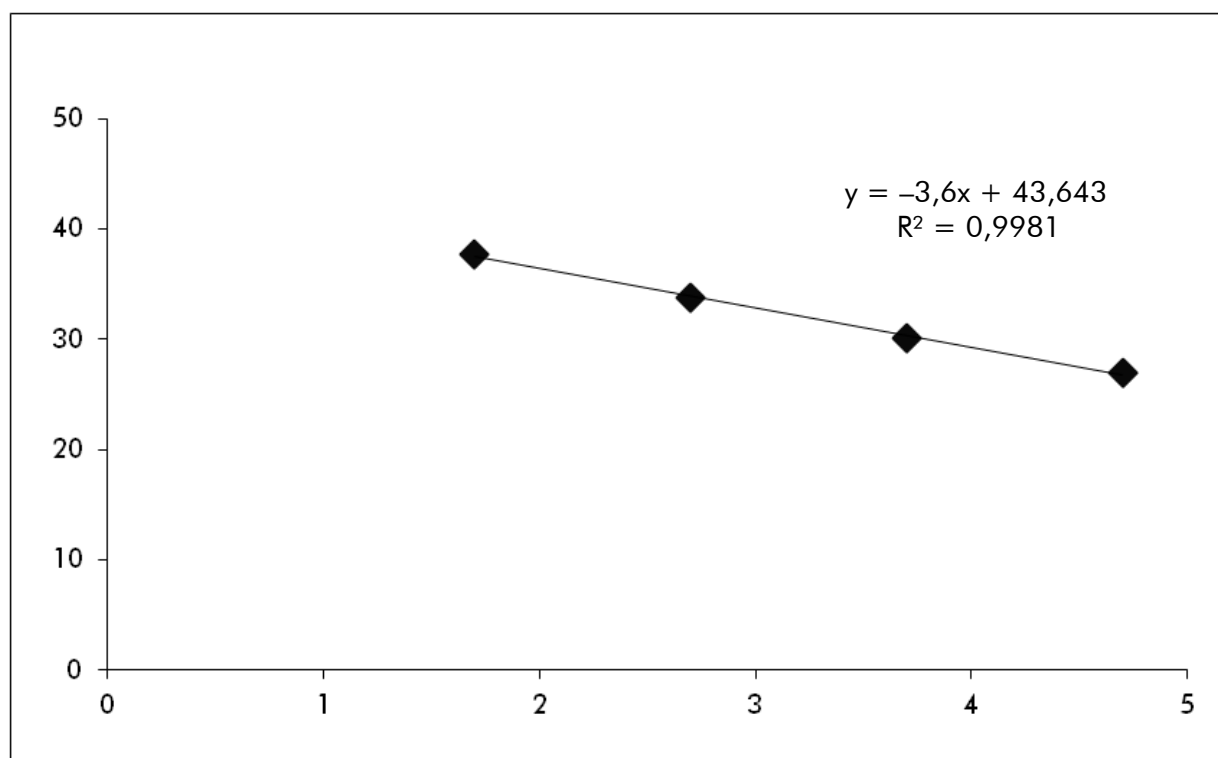


Figura 10. Curva patrón para el alelo nativo del gen JAK2.

Dado que los patrones corresponden a diluciones de 10 veces, la pendiente teórica de la curva es -3,32. Una pendiente entre -3,0 y -3,9 es aceptable

siempre que R^2 sea $> 0,95$ (12). Sin embargo, es deseable un valor de $R^2 > 0,98$ para que los resultados sean precisos (13).

Las ecuaciones de las curvas patrón pueden utilizarse posteriormente para calcular los \log_{10} del número de copias de los alelos V617F y nativo en las muestras desconocidas.

La ecuación de la curva patrón del alelo V617F debe emplearse para transformar los valores medios brutos de C_P/C_T (obtenidos con PPM-VF) para las muestras desconocidas y de control en los números de copias del alelo V617F del gen JAK2 (CN_{V617F}).

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{valor medio de } C_{pV617F} - \text{ordenada en el origen de la curva patrón}_{V617F})}{\text{Pendiente de la curva patrón}_{V617F}}$$

La ecuación de la curva patrón del alelo nativo debe emplearse para transformar los valores medios brutos de C_P/C_T (obtenidos con PPM-WT) para las muestras desconocidas y de control en los números de copias del alelo nativo del gen JAK2 (CN_{WT}).

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{valor medio de } C_{pWT} - \text{ordenada en el origen de la curva patrón}_{WT})}{\text{Pendiente de la curva patrón}_{WT}}$$

Expresión de los resultados

Los resultados corresponden a 25 ng de ADN genómico total y deben expresarse como porcentaje del alelo V617F del gen JAK2 de la siguiente forma:

$$\% \text{ de V617F del gen JAK2} = \frac{CN_{V617F}}{(CN_{V617F} + CN_{WT})} \times 100$$

Reproducibilidad entre duplicados

Los datos obtenidos tienen que ser uniformes entre los duplicados.

Controles positivos y negativos

El control positivo o PC-VF debe dar un porcentaje de V617F del gen JAK2 superior al 99,9%.

El control negativo o NC-VF debe dar un porcentaje de V617F del gen JAK2 inferior al 0,1%.

Si estos controles no funcionan correctamente, consulte el apartado "Guía de resolución de problemas", página 37, para encontrar una solución.

Controles de agua

Los controles negativos deben dar un valor de CN de cero para la detección tanto del alelo V617F del gen JAK2 como del alelo nativo del gen JAK2.

Un valor positivo del control de agua es consecuencia de una contaminación cruzada. Consulte el apartado "Guía de resolución de problemas", más adelante, para encontrar una solución.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas le será de utilidad para resolver los problemas que puedan surgir. Para obtener más información, consulte también la página de preguntas frecuentes de nuestro Centro de Soporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del Servicio Técnico de QIAGEN estarán siempre encantados de responder a cualquier pregunta que pueda usted tener sobre la información y el protocolo de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en el apartado "Información de contacto", página 46).

Comentarios y sugerencias

La curva patrón del alelo nativo o V617F no es lineal

Inversión del vial, inversión durante la distribución, contaminación cruzada, degradación parcial del patrón, reactivo de RQPCR, amplificación inespecífica o error del programa de PCR

Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.

Conservar el kit *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* entre -15 °C y -30 °C y mantener las mezclas de primers y sonda protegidas de la luz. Consulte "Almacenamiento y manipulación de los reactivos", página 15.

Evitar la congelación y descongelación repetidas.

Comentarios y sugerencias

Ausencia de señal o señal baja para un patrón

Patrón no distribuido, o uso de la misma mezcla PPM	Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Repetir la serie de PCR.
---	--

El control negativo (H₂O) da positivo

Contaminación cruzada, contaminación del reactivo, error del instrumento, inversión del pocillo o del capilar o degradación de la sonda	Sustituir todos los reactivos críticos. Manipular siempre las muestras, los componentes del kit y los consumibles según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación por arrastre. Mantener las mezclas de primers y sonda protegidas de la luz. Comprobar si hay positivos falsos en las curvas de fluorescencia.
---	---

Ausencia de señal, incluso en el control patrón

a) Se ha seleccionado un canal de detección incorrecto	Fijar el canal en F1/F2 o 530 nm/640 nm.
b) Error de pipeteo u omisión de reactivos	Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Repetir la serie de PCR.
c) No hay ningún programa de adquisición de datos	Comprobar el programa del ciclo. Seleccionar el modo de adquisición "Single" al final de cada segmento de hibridación del programa de PCR.

Ausencia de señal o señal baja en las muestras, pero los controles patrón son correctos

Efectos inhibidores del material de la muestra causados por una purificación insuficiente	Verificar siempre la calidad (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀) y la concentración del ADN antes de empezar. Repetir la preparación del ADN.
---	--

Intensidad de fluorescencia demasiado baja

- a) Almacenamiento incorrecto de los componentes del kit
- Dividir los reactivos en partes alícuotas para su conservación.
- Conservar el kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* entre -15 °C y -30 °C y mantener las mezclas de primers y sonda protegidas de la luz. Consulte "Almacenamiento y manipulación de los reactivos", página 15.
- Evitar la congelación y descongelación repetidas.
- b) Cantidad inicial de ADN diana demasiado baja
- Comprobar la cantidad de ADN de la muestra.
- Nota:** Dependiendo del método seleccionado para la preparación del ADN pueden producirse efectos inhibidores.

Los controles negativos dan positivo

- Contaminación por arrastre
- Sustituir todos los reactivos críticos.
- Repetir el experimento con nuevas partes alícuotas de todos los reactivos.
- Manipular siempre las muestras, los componentes del kit y los consumibles según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación por arrastre.

La intensidad de la fluorescencia varía

- a) Error de pipeteo
- Mezclar con vórtex y centrifugar todos los reactivos una vez descongelados.
- La variabilidad del LightCycler causada por el llamado "error de pipeteo" puede reducirse analizando los datos en el modo F1/F2 o 530 nm/640 nm.

Comentarios y sugerencias

- | | |
|--|--|
| b) Centrifugación insuficiente de la placa, los tubos o los capilares, o es posible que la mezcla de PCR preparada siga en el extremo superior del capilar, o es posible que haya una burbuja de aire atrapada en la punta del capilar | Centrifugar siempre los capilares cargados con la mezcla de reacción según se describe en el manual de uso específico del aparato. |
| c) Superficie externa de la punta del capilar sucia | Utilizar siempre guantes cuando se manipulen los capilares. |

Señal de los controles positivos del alelo nativo o del alelo V617F usando la PPM recíproca

Contaminación cruzada, contaminación del reactivo o inversión del pocillo o del capilar

Sustituir todos los reactivos críticos.
Repetir el experimento con nuevas partes alícuotas de todos los reactivos.
Manipular siempre las muestras, los componentes del kit y los consumibles según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación por arrastre.
Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.

Detección invertida de control positivo

Inversión en la distribución de la PPM en el pocillo o en el capilar o en la premezcla

Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.

Uno o ambos controles positivos no dan señal

Se ha omitido la PPM o el ADN de control

Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.

Fondo intenso

Decoloración del fluoróforo

Guardar y manipular la sonda protegida de la luz.

Baja reproducibilidad para las muestras duplicadas

Error de pipeteo o contaminación cruzada

Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto. Los certificados de los análisis pueden solicitarse en www.qiagen.com/support/.

Limitaciones

Antes de utilizar este dispositivo, los usuarios deberán recibir la formación pertinente y estar familiarizados con esta tecnología. Este kit debe utilizarse siguiendo las instrucciones recogidas en este manual y con uno de los instrumentos validados mencionados en el apartado "Materiales necesarios pero no suministrados", página 12.

Todo resultado diagnóstico que se genere debe interpretarse en combinación con otros hallazgos clínicos o de laboratorio. Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema para cualquier procedimiento utilizado en su laboratorio que no haya sido avalado por los estudios de rendimiento de QIAGEN.

Debe prestarse atención a las fechas de caducidad impresas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.

Características del rendimiento

Estudios no clínicos

Precisión

Se realizó un estudio de precisión con 12 muestras de ADN extraído de líneas celulares correspondientes a distintas cargas del alelo V617F del gen JAK2. Se realizó un total de 80 mediciones en cada muestra empleando 3 lotes diferentes del kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant. En este estudio de precisión se empleó un instrumento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Los datos analíticos se resumen en la tabla 15.

Tabla 15. Datos de precisión de las muestras de ADN.

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

* Se excluyeron los valores atípicos. Los valores atípicos son aquellos que quedan por debajo del cuartil inferior menos 3 veces el intervalo intercuartílico o por encima del cuartil superior más 3 veces el intervalo intercuartílico en un diagrama de caja.

n = número de muestras validadas; CV = coeficiente de variación global.

Límite de blanco y límite de detección

El nivel de fondo o nivel de blanco (LOB, *limit of blank*) se determinó en muestras negativas (8 muestras, 76 mediciones). Este valor fue del 0,014%.

El límite de detección (LOD, *limit of detection*) se determinó empleando muestras que se sabía que eran positivas pero con una expresión baja (7 muestras, 68 mediciones). Este valor fue del 0,061%, con un límite superior del intervalo de confianza del 90% de 0,091%.

Esta sensibilidad óptima puede obtenerse en muestras que contengan al menos 10.000 copias del gen JAK2 (alelo nativo o alelo mutante V617F).

Los datos de cuantificación se expresarán de la siguiente manera.

- Un valor del alelo mutante V617F del gen JAK2 $\leq 0,014\%$ puede interpretarse como ausencia de detección de la mutación V617F del gen JAK2.
- Un valor del alelo V617F del gen JAK2 $> 0,014\%$ pero $< 0,091\%$ puede interpretarse como resultado no concluyente.
- Un valor del alelo V617F del gen JAK2 $\geq 0,091\%$ puede interpretarse como resultado positivo y detección de la mutación V617F del gen JAK2.

Linealidad

Se realizaron estudios de linealidad en 12 muestras, cada una obtenida de una mezcla diferente de ADN extraído de líneas celulares positivas y negativas para la mutación V617F del gen JAK2. Cada muestra se analizó 5 veces. Los datos de este estudio mostraron que el kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* dio resultados lineares en el intervalo dinámico.

Estudios clínicos

Se extrajo ADN de sangre o de médula ósea de 87 muestras de pacientes y se analizó con el kit *ipsogen JAK2 MutaQuant*. Además, se cuantificó el porcentaje de mutaciones V617F del gen JAK2 y se comparó con los resultados de una prueba de detección sistemática obtenida con el kit *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ* (n.º de referencia 673223). Los datos obtenidos se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Tabla de contingencia que muestra la concordancia entre los resultados obtenidos con el kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* y con el kit *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ*.

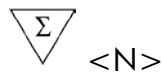
		Resultados del kit <i>ipsogen JAK2 MutaScreen EZ</i>			n
		Mutación detectada	Resultado no concluyente	Mutación no detectada	
Resultados del kit <i>ipsogen JAK2 MutaQuant</i>	Mutación detectada	40	2	7	49
	Resultado no concluyente	0	0	21	21
	Mutación no detectada	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Concordancia positiva	100% (intervalo de confianza del 95%: 91%, 100%)				
Concordancia negativa	71% (intervalo de confianza del 95%: 51%, 85%)				
Concordancia global	89% (intervalo de confianza del 95%: 79%, 95%)				

Referencias

1. National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT_008413..
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
3. Levine, R. L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
5. Baxter, E. J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, **22**, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865.
12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Símbolos

Los siguientes símbolos pueden aparecer en el envase y en el etiquetado:



Contiene reactivos suficientes para <N> reacciones



Fecha de caducidad



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Número de referencia



Número de lote



Número de material



Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar instrucciones de uso

Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, consulte nuestro Centro de Soporte Técnico en www.qiagen.com/Support, llame al número de teléfono 00800-22-44-6000 o póngase en contacto con uno de los departamentos de Servicio Técnico de QIAGEN o distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de referencia
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Para 12 reacciones: gen de control del alelo nativo del gen JAK2, gen de control del alelo mutante V617F del gen JAK2, mezcla de primers y sonda PPM-WT, mezcla de primers y sonda PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Para 24 reacciones: gen de control del alelo nativo del gen JAK2, gen de control del alelo mutante V617F del gen JAK2, mezcla de primers y sonda PPM-WT, mezcla de primers y sonda PPM-VF	673523
Rotor-Gene Q MDx: para análisis de PCR en tiempo real validado para diagnóstico in vitro en aplicaciones clínicas		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no se incluye la instalación y la formación	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía de usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías de usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al Servicio Técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Este producto está indicado para diagnóstico in vitro. Los productos *ipsogen* no deben ser revendidos, modificados para reventa ni utilizados para fabricar otros productos comerciales sin la autorización por escrito de QIAGEN.

La información del presente documento puede ser modificada sin previo aviso. QIAGEN no asume ninguna responsabilidad por los errores que puedan encontrarse en este documento. Este documento se considera íntegro y exacto en el momento de su publicación. QIAGEN declina toda responsabilidad por daños fortuitos, especiales, múltiples o derivados del uso de este documento.

Se garantiza que los productos *ipsogen* cumplen las especificaciones indicadas. La única obligación de QIAGEN y la única compensación al cliente se limitan a la sustitución de los productos sin cargo en el caso de que estos no funcionen de acuerdo a la garantía.

La mutación V617F del gen JAK2 y los usos que se hagan de ella están protegidos por derechos de patente, entre los que se incluyen la patente europea EP1692281, las patentes estadounidenses 7,429,456 y 7,781,199, las solicitudes de patente en Estados Unidos US20090162849 y US20120066776 y sus equivalentes en otros países.

La compra de este producto no confiere ningún derecho de empleo en ensayos clínicos de fármacos dirigidos a JAK2V617F. QIAGEN desarrolla programas de licencia específicos para tales usos. Póngase en contacto con nuestro departamento jurídico en la dirección de correo electrónico jak2licenses@qiagen.com.

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

Acuerdo de licencia limitada

La utilización de este producto implica la aceptación de los siguientes términos por parte de cualquier comprador o usuario del kit *ipsogen* JAK2 *MutaQuant*:

1. El kit *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* puede ser utilizado exclusivamente de acuerdo con el *Manual del kit ipsogen JAK2 MutaQuant* y empleando únicamente los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el *Manual del kit ipsogen JAK2 MutaQuant* y en protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de garantía limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

