

# Manual do kit *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 *MutaQuant*<sup>®</sup>

 12 (n.º de catálogo 673522)

 24 (n.º de catálogo 673523)

Versão 1

**IVD**

Diagnóstico in vitro quantitativo

Para usar com instrumentos Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup>  
7900HT SDS, Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR System  
e LightCycler<sup>®</sup>



**REF** 673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

**R3**

**MAT**

1072501PT



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostragem e ensaio, permitindo o isolamento e a detecção do conteúdo de qualquer amostra biológica. Os produtos e serviços avançados e de elevada qualidade da nossa empresa são garantia de sucesso, desde a amostra ao resultado.

### **A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:**

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Ensaio de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microARN e ARNi
- Automatização de tecnologias de amostragem e ensaio

A nossa missão permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para mais informações, visite [\*\*www.qiagen.com\*\*](http://www.qiagen.com).

# Conteúdo

<b>Finalidade da utilização</b>	<b>4</b>
<b>Resumo e explicação</b>	<b>4</b>
<b>Princípio do procedimento</b>	<b>7</b>
<b>Materiais fornecidos</b>	<b>10</b>
Conteúdo do kit	10
<b>Materiais necessários, mas não fornecidos</b>	<b>11</b>
<b>Avisos e precauções</b>	<b>12</b>
Precauções gerais	12
<b>Armazenamento e manuseamento de reagente</b>	<b>13</b>
<b>Procedimento</b>	<b>14</b>
Preparação da amostra de ADN	14
Protocolos	
■ qPCR em instrumentos RotorGene Q MDx 5plex HRM ou RotorGene Q 5plex HRM com rotor de 72 tubos	15
■ qPCR em instrumento ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e LightCycler 480	20
■ qPCR no instrumento LightCycler 1.2	27
<b>Interpretação dos resultados</b>	<b>32</b>
Guia de resolução de problemas	36
<b>Controlo da qualidade</b>	<b>40</b>
<b>Limitações</b>	<b>40</b>
<b>Características de desempenho</b>	<b>41</b>
Estudos não clínicos	41
Estudos clínicos	42
<b>Referências</b>	<b>44</b>
<b>Símbolos</b>	<b>45</b>
<b>Informações de contacto</b>	<b>45</b>
<b>Informações para encomenda</b>	<b>46</b>

## Finalidade da utilização

O kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* é um teste quantitativo *in vitro* que se destina à deteção e quantificação do alelo JAK2 V617F/G1849T em ADN genómico extraído de sangue periférico de indivíduos com suspeita de neoplasia mieloproliferativa (NMP).

A ausência da mutação JAK2 V617F/G1849T não exclui a presença de outras mutações JAK2. As análises podem indicar resultados negativos falsos em caso de mutações adicionais localizadas nos nucleótidos 88504 a 88622 (1).

**Nota:** O kit deve ser utilizado observando as instruções constantes deste manual em combinação com reagentes e instrumentos validados. Qualquer outra utilização não indicada deste produto e/ou modificação dos componentes anulará qualquer responsabilidade da QIAGEN.

## Resumo e explicação

Uma mutação somática recorrente, V617F, que afeta o gene da tirosina quinase Janus 2 (JAK2), foi identificada em 2005 (2–5), levando ao principal ponto de viragem na compreensão, classificação e diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas (NMP). A JAK2 é uma molécula intracelular essencial para diversas citoquinas, incluindo a eritropoietina.

A mutação JAK2 V617F é detetada em >95% dos doentes com policitemia vera (PV), 50–60% dos doentes com trombocitopenia essencial (TE) e em 50% dos doentes com mielofibrose primária (MFP). A JAK2 V617F também foi detetada em alguns casos raros de leucemia mielomonocítica crónica, síndrome mielodisplásico, mastocitose sistémica e leucemia neutrofílica crónica, mas em 0% de leucemia mieloide crónica (LMC) (6).

A mutação corresponde a uma alteração de um único nucleótido, o nucleótido 1849 da JAK2 no exão 14, resultando numa substituição de uma valina (V) por fenilalanina (F) na posição 617 da proteína (domínio JH2). Provoca a ativação constitutiva da JAK2, transformação hematopoiética *in vitro* e crescimento de colónias eritroides endógenas (CEE) em todos os doentes com PV e numa grande parte de doentes de TE e MFP (7). A JAK2 V617F representa um impulsor essencial na transformação de células hematopoiéticas em NMP, mas os mecanismos patológicos exatos que, com a mesma e única mutação, levam a entidades clínicas e biológicas tão diferentes continuam por esclarecer na sua totalidade.

Tradicionalmente, o diagnóstico das NMPs baseava-se em critérios clínicos, de histologia da medula óssea e citogenéticos. A descoberta de um marcador molecular específico da doença resultou na simplificação do processo e numa maior exatidão do diagnóstico. A deteção da mutação JAK2 V617F faz agora

parte dos critérios de referência da OMS 2008 para o diagnóstico de NMP BCR-ABL negativa (ver tabela 1) e a presença desta mutação é um dos principais critérios para a confirmação do diagnóstico.

**Tabela 1. Critérios da OMS para o diagnóstico de NMP (adaptado da referência 8)**

Critérios para um diagnóstico de policitemia vera (PV)	
Critérios Major	1. Hemoglobina (Hgb) $>18,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (homens) ou $>16,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (mulheres) ou Hgb ou hematócrito (Hct) $>$ percentil 99 do intervalo de referência para idade, sexo ou altitude de residência ou Hgb $>17 \text{ g.dl}^{-1}$ (homens) ou $>15 \text{ g.dl}^{-1}$ (mulheres) se associado ao aumento sustentado de $\geq 2 \text{ g.dl}^{-1}$ a partir da linha de base, que não pode ser atribuída à correção da deficiência de ferro ou Massa elevada de eritrócitos $>25\%$ acima do valor médio normal previsto
	2. Presença de <i>JAK2V617F</i> ou mutação idêntica
Critérios Minor	1. Mieloproliferação das 3 linhagens na medula óssea 2. Nível subnormal de eritropoietina no soro 3. Crescimento de colônias eritroides endógenas (CEE)
Critérios para um diagnóstico de trombocitopenia essencial (TE)	
Critérios Major	1. Contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ 2. Proliferação de megacariócitos com morfologia grande e madura. Nenhuma ou pouca proliferação de granulócitos ou eritroides 3. Não cumprimento dos critérios da OMS para leucemia mieloide crônica (LMC), PV, mielofibrose primária (MFP), síndrome mielodisplásico (SMD) ou outras neoplasias mieloides 4. Demonstração de <i>JAK2V617F</i> ou outro marcador clonal ou Nenhuma evidência de trombocitose reativa
Critérios Minor	-
Critérios para um diagnóstico de mielofibrose primária (MFP)	
Critérios Major	1. Presença de proliferação megacariocítica e atipia, acompanhada de fibrose por reticulina ou colágeno Na ausência de fibrose reticular significativa, as alterações megacariocíticas devem ser acompanhadas de aumento da celularidade medular caracterizada por proliferação granulocítica e, frequentemente, por diminuição da eritropoiese (isto é, MFP pré-fibrótica) 2. Não cumprimento dos critérios da OMS para (LMC), PV, SMD ou outras neoplasias mieloides 3. Demonstração de <i>JAK2V617F</i> ou outro marcador clonal ou Nenhuma evidência de fibrose medular reativa
Critérios Minor	1. Leucoeritroblastose 2. Aumento da concentração sérica da lactato-desidrogenase (LDH) 3. Anemia 4. Esplenomegalia palpável

Recentemente, especialistas internacionais propuseram critérios para ensaios terapêuticos em PV e TE. Com base em dados sobre transplante alogênico, interferão alfa ou hidroxureia, a quantificação de JAK2V617F foi incorporada como uma ferramenta potencialmente útil para monitorizar a resposta ao tratamento (9). Foi observada uma redução na carga de JAK2 V617F em resposta a alguns dos novos fármacos anti-JAK2 escolhidos em desenvolvimento clínico (10).

## Princípio do procedimento

Têm sido propostas várias técnicas diferentes para determinar quantitativamente a proporção de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) em amostras de ADN. Destes, são preferíveis os métodos com base em reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) devido à sua mais elevada sensibilidade, que permite a monitorização da carga de alelos de forma longitudinal. Muitas destas técnicas possuem uma sensibilidade moderada de 1–10%, por exemplo, a discriminação de alelos TaqMan<sup>®</sup>, Pyrosequencing<sup>®</sup> (pirosequenciação), ensaio de curva de fusão e sequenciação direta. Alguns, como a curva de fusão e a sequenciação, são apenas semiquantitativos, enquanto outros, como a pirosequenciação, requerem processamento pós-PCR ou instrumentação que não se encontra prontamente disponível ou que tem custos de preparação proibitivos para testes laboratoriais de rotina. Uma abordagem altamente sensível, com uma sensibilidade <0,1% envolve a utilização de um primer específico de SNP, que permite a amplificação seletiva do alelo mutante ou de tipo selvagem facilmente detetável num instrumento de qPCR em tempo real. O kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant baseia-se nesta técnica.

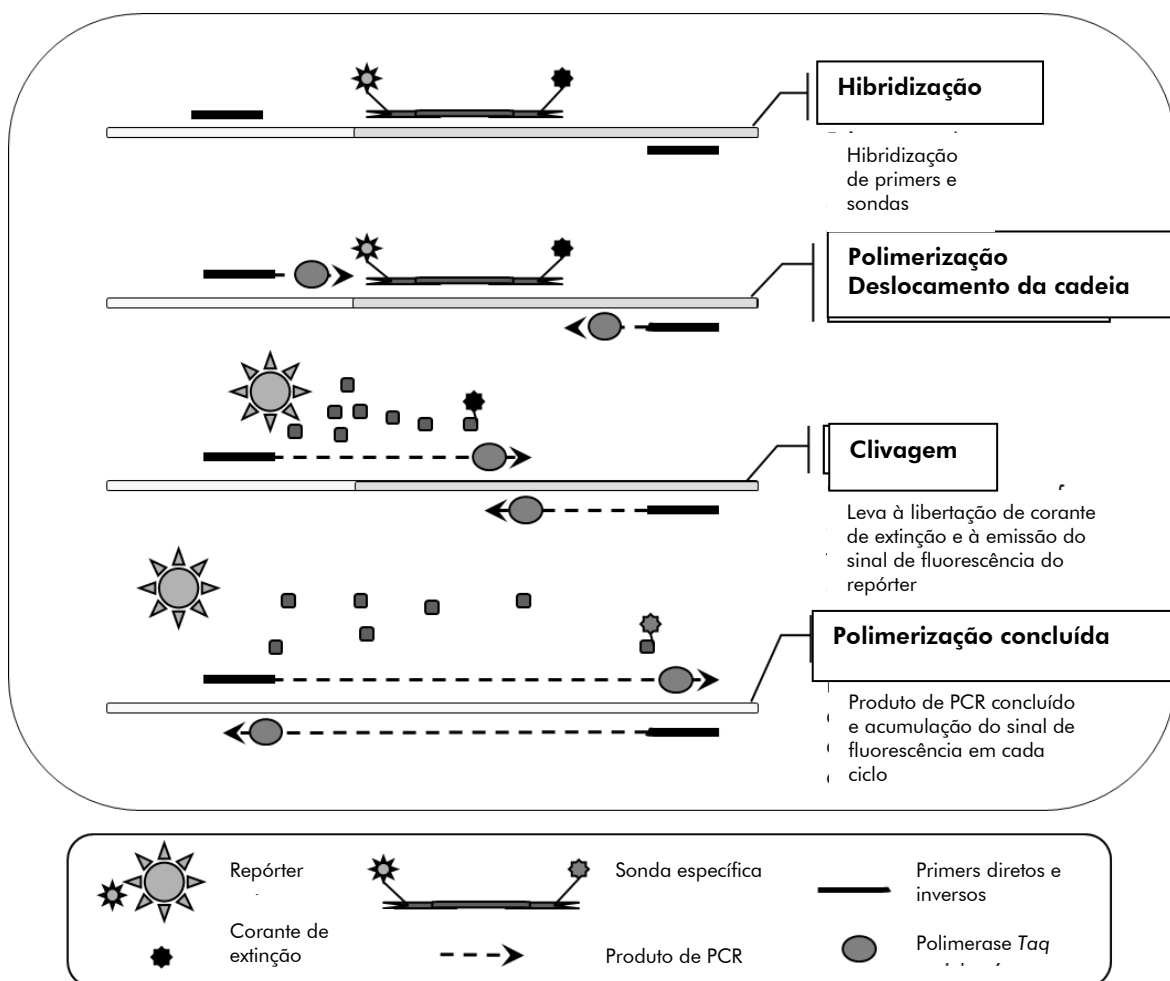
A qPCR permite a quantificação exata de produtos de PCR durante a fase exponencial do processo de amplificação da PCR. Os dados quantitativos da PCR podem ser obtidos rapidamente sem processamento pós-PCR, através de deteção em tempo real de sinais de fluorescência durante e/ou após o ciclo da PCR, reduzindo, assim, drasticamente, o risco de contaminação do produto de PCR. Atualmente, estão disponíveis 3 tipos principais de técnicas de qPCR: A análise de qPCR usando corante SYBR<sup>®</sup> Green I, a análise de qPCR usando sondas de hidrólise e a análise de qPCR usando sondas de hibridação.

Este ensaio explora o princípio de hidrólise de oligonucleótido de duplo corante por qPCR. Durante a PCR, os primers diretos e inversos hibridam-se numa sequência específica. Um oligonucleótido de duplo corante está contido na mesma mistura. Esta sonda, que consiste num oligonucleótido rotulado com um corante repórter 5' e um corante de extinção 3' a jusante, hibrida-se para uma sequência alvo dentro do produto de PCR. A análise qPCR com sondas de hidrólise explora a atividade exonuclease 5'→3' da ADN-polimerase *Thermus aquaticus* (*Taq*). Quanto a sonda está intacta, a proximidade do corante

repórter em relação ao corante de extinção resulta na supressão da fluorescência do repórter, principalmente através de transferência de energia do tipo Förster.

Durante a PCR, se o alvo de interesse estiver presente, a sonda hibrida-se especificamente entre os locais de primer direto e inverso. A atividade exonuclease 5'→3' da ADN-polimerase faz a clivagem da sonda entre o corante repórter e o de extinção somente se a sonda se hibridar com o alvo. Os fragmentos da sonda são, depois, deslocados do alvo, continuando a polimerização da cadeia. A extremidade 3' da sonda é bloqueada para prevenir a extensão da sonda durante a PCR (figura 1). Este processo ocorre em cada ciclo e não interfere com a acumulação exponencial de produto.

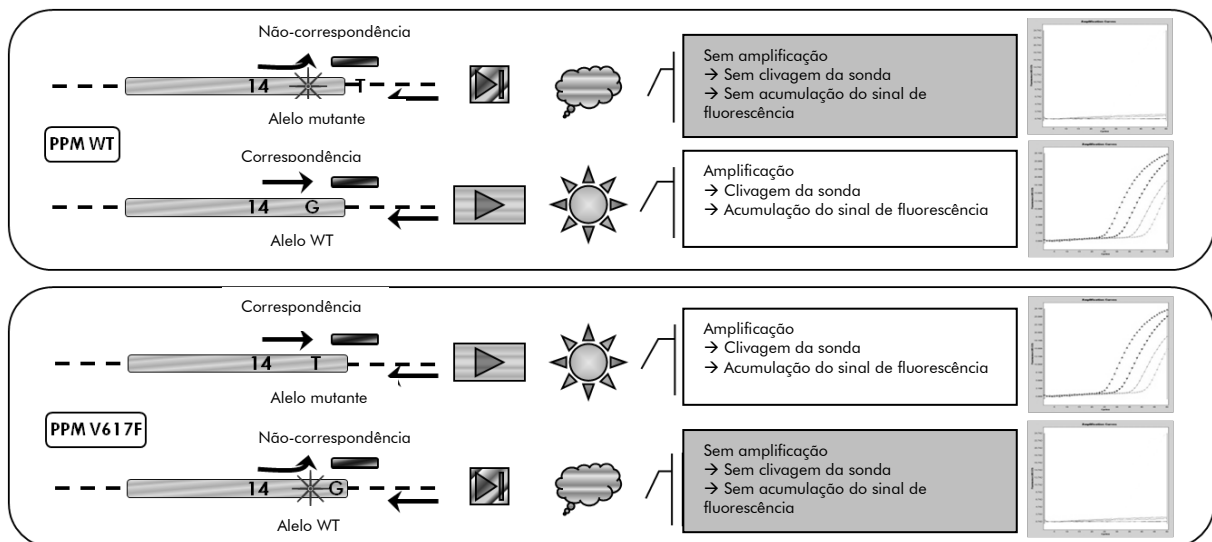
O aumento do sinal de fluorescência é detetado apenas se a sequência alvo for complementar à sonda e, por conseguinte, for amplificada durante a PCR. Devido a estes requisitos, a amplificação não específica não é detetada. Por conseguinte, o aumento da fluorescência é diretamente proporcional à amplificação do alvo durante a PCR.



**Figura 1: Princípio de reação.**



A tecnologia de PCR específica de alelo usada neste kit de ensaio permite uma detecção sensível, exata e altamente reprodutível de polimorfismos de nucleótido único (SNPs). Esta técnica baseia-se na utilização de primers diretos específicos para o alelo de tipo selvagem e para o alelo V617F (11). Somente uma correspondência perfeita entre o primer e o ADN alvo permite a extensão e a amplificação no PCR (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 reações separadas conduzidas usando 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

<b>ipsogen JAK2 MutaQuant Kit</b>		<b>(12)</b>	<b>(24)</b>
<b>N.º de catálogo</b>		<b>673522</b>	<b>673523</b>
<b>Número de reações</b>		<b>12</b>	<b>24</b>
V617F Positive Control (100% V617F allele) (controlo positivo V617F (100% alelo V617F))	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F Negative Control (controlo negativo V617F) (100% alelo de tipo selvagem)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution, 50 copies (diluição do padrão M1-VF, 50 cópias) (5 x 10 <sup>1</sup> V617F cópias/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution, 500 copies (diluição do padrão M2-VF, 500 cópias) (5 x 10 <sup>2</sup> V617F cópias/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution, 5000 copies (diluição do padrão M3-VF, 5000 cópias) (5 x 10 <sup>3</sup> V617F cópias/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution, 50,000 copies (diluição do padrão M4-VF, 50 000 cópias) (5 x 10 <sup>4</sup> V617F cópias/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution, 50 copies (diluição do padrão WT-2, 500 cópias) (5 x 10 <sup>2</sup> cópias de tipo selvagem/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution, 500 copies (diluição do padrão WT-2, 500 cópias) (5 x 10 <sup>2</sup> cópias de tipo selvagem/5 µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl
WT-3 Standard Dilution, 5000 copies (diluição do padrão WT-4, 5 000 cópias) (5 x 10 <sup>4</sup> cópias de tipo selvagem/5 µl)	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl

WT-4 Standard Dilution, 50.000 copies (diluição do padrão WT-4, 50 000 cópias) ( $5 \times 10^4$ cópias de tipo selvagem/5 $\mu$ l)	WT-4 WT-4 Mini	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l
Primers and Probe Mix JAK2 WT* (primers e mistura de sondas JAK2 WT*)	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 $\mu$ l	95 $\mu$ l
Primers and Probe Mix JAK2 V617F† (primers e mistura de sondas JAK2 V617F)	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 $\mu$ l	95 $\mu$ l
ipsogen <i>JAK2 MutaQuant Kit Handbook</i> (inglês)		1	1

\* Mistura de primers diretos e inversos específicos para o gene de controlo de tipo selvagem JAK2 mais uma sonda específica FAM™–TAMRA™.

† Mistura de primers diretos e inversos específicos para a mutação JAK2 V617F mais uma sonda específica FAM–TAMRA.

**Nota:** antes de os usar, agite no vórtex e centrifugue, por instantes, as diluições do padrão, bem como os primers e as misturas de sondas.

## Materiais necessários, mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDSs) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

### Reagentes

- Água para uso em PCR sem nuclease
- Tampão e Taq ADN-polimerase: Os reagentes validados são TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, cat. n.º 4304437) e LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, cat. n.º 04535286001) ou LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe® (Master Mix 5x) (Roche, cat. n.º 03515567001)

### Consumíveis

- Pontas de pipetas de PCR, estéreis, sem nuclease e resistentes a aerossóis com filtros hidrófobos
- Tubos PCR sem nuclease de 0,5 ml ou 1,5 ml
- Gelo

## Equipamento

- Pipeta microlitro\* dedicadas para PCR (1–10  $\mu$ l; 10–100  $\mu$ l; 100–1000  $\mu$ l)
- Centrífuga de bancada\* com rotor para tubos de reação de 0,5 ml/1,5 ml e microplacas (capaz de atingir 13 000–14 000 rpm)
- Instrumento de PCR em tempo real:\* Rotor-Gene Q 5plex HRM® ou outro Rotor
- Biofotómetro

## Avisos e precauções

Para utilização em diagnóstico in vitro

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDSs). Estas estão disponíveis online em formato PDF, cómodo e compacto, no endereço [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), onde poderá encontrar, visualizar e imprimir as SDSs para cada kit da QIAGEN e respetivos componentes.

Elimine as amostras e os resíduos do ensaio de acordo com os regulamentos de segurança locais.

## Precauções gerais

A utilização de testes de qPCR requer boas práticas laboratoriais (incluindo a manutenção do equipamento) dedicadas a biologia molecular e em conformidade com os regulamentos aplicáveis e as normas correspondentes.

Este kit destina-se à utilização em diagnóstico in vitro. Os reagentes e as instruções fornecidos neste kit foram validados para um desempenho ideal.

A diluição adicional dos reagentes ou a alteração dos tempos e temperaturas de incubação podem dar origem a dados erróneos ou discordantes. Os reagentes PPM-WT e PPM-VF podem ser alterados se expostos à luz. Todos os reagentes são formulados especificamente para utilização com este teste. Para um desempenho ideal do teste não se devem realizar substituições.

\* Assegure-se de que os instrumentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Tenha um cuidado extremo para prevenir:

- Contaminação com DNase que pode provocar a degradação do modelo de ADN.
- Contaminação por transporte com ADN ou PCR, provocando um sinal falso positivo

Por conseguinte, recomendamos o seguinte:

- Utilização de material de laboratório sem nuclease (p. ex., pontas de pipetas, frascos-ampola de reação) e de luvas durante a realização do ensaio.
- Utilização de pontas de pipetas novas e resistentes a aerossóis em todas as fases de pipetagem, para evitar a contaminação cruzada das amostras e dos reagentes.
- Preparação da pré-mistura principal de PCR com material dedicado (pipetas, pontas, etc.) numa área dedicada onde não sejam introduzidas matrizes de ADN (ADN, plasmídeo ou produtos de PCR). Adição do modelo numa zona separada (preferencialmente numa sala em separado) com material específico (pipetas, pontas, etc.).

## **Armazenamento e manuseamento de reagente**

Os kits são expedidos em gelo seco e devem ser guardados entre  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  após a receção.

- Minimizar a exposição à luz dos primers e das misturas de sondas (tubos PPM-WT e PPM-VF).
- Misturar e centrifugar cuidadosamente os tubos antes de os abrir.
- Conservar todos os componentes do kit nas embalagens originais.

Estas condições de conservação aplicam-se tanto a componentes abertos como fechados. Os componentes conservados noutras condições que não as indicadas nos rótulos podem não apresentar um desempenho apropriado e afetar negativamente os resultados do ensaio.

As datas de validade de cada reagente estão indicadas nos rótulos dos componentes individuais. O produto manterá o seu desempenho até à data de validade impressa no rótulo, desde que mantido nas condições de conservação corretas.

Não existem sinais óbvios para indicar a instabilidade deste produto. No entanto, controlos positivos e negativos devem ser executados simultaneamente com amostras desconhecidas.

## Procedimento

### Preparação da amostra de ADN

O ADN genómico deve ser obtido de sangue total, linfócitos periféricos purificados de sangue total, células polinucleares ou granulócitos. Para resultados comparáveis, recomenda-se que seja usada a mesma fração celular e o mesmo método de extração de ADN. A extração do ADN pode ser feita mediante um método interno ou um kit disponível no comércio.

A quantidade de ADN deve ser determinada medindo a densidade ótica (DO) da amostra a 260 nm e a qualidade do ADN pode ser determinada por espectrofotometria ou eletroforese de gel\*.

- O rácio de  $DO_{260}/DO_{280}$  deve ser 1,7–1,9 e rácios inferiores a este podem indicar contaminação por proteínas ou a presença de químicos orgânicos.
- A análise por eletroforese num gel de agarose\* a 0,8–1,0% deve permitir a visualização do ADN isolado como uma banda distinta de cerca de 20 kb (um ligeiro esfregaço permitirá obter resultados aceitáveis).

O ADN resultante tem de ser diluído para uma concentração de 5 ng/ $\mu$ l em 1x tampão TE\* com pH 8.0 e depois conservado entre +4 e +8°C durante 1 semana ou a –20°C para períodos de tempo mais prolongados.

A reação de qPCR é otimizada para amostras de ADN contendo 25 ng de ADN genómico purificado.

\* Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDSs) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

## Protocolo: qPCR em instrumentos RotorGene Q MDx 5plex HRM ou RotorGene Q 5plex HRM com rotor de 72 tubos

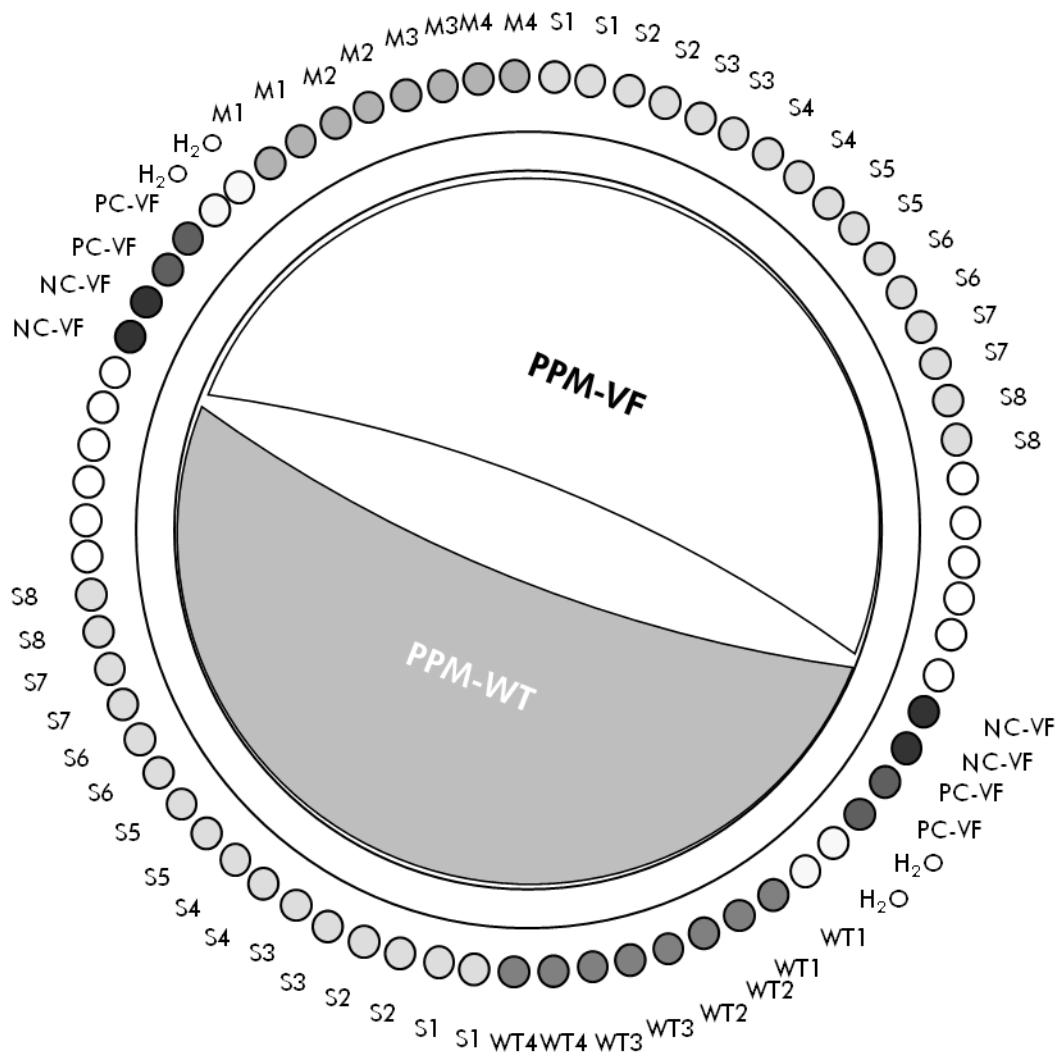
Usando este instrumento, recomendamos a realização de todas as medições em duplicado, conforme indicado na tabela 2.

**Tabela 2: Número de reações para instrumentos Rotor-Gene Q com rotor de 72 tubos**

<b>Amostras</b>	<b>Reações</b>
<b>Com os primers e mistura de sondas JAK2 V617F (PPM-VF)</b>	
4 padrões M-VF	8 reações, cada uma testada em duplicado
n amostras de ADN	n x 2 reações
2 controlos de ADN	4 reações: controlo positivo (PC-VF) e controlo negativo (NC-VF), cada um testado em duplicado
Controlo de água	2 reações
<b>Com os primers de tipo selvagem JAK2 e mistura de sondas (PPM-WT)</b>	
4 padrões de tipo selvagem	8 reações, cada uma testada em duplicado
n amostras de ADN	n x 2 reações
2 controlos de ADN	4 reações: PC-VF e NC-VF, cada uma testada em duplicado
Controlo de água	2 reações

### Processamento de amostras em instrumentos Rotor-Gene Q com rotor de 72 tubos

Recomendamos o teste de, pelo menos, 8 amostras de ADN com o kit de 24 reações (n.º de catálogo 673523) e de, pelo menos, 6 amostras de ADN com o kit de 12 reações (n.º de catálogo 673522) no mesmo ensaio para otimizar a utilização de padrões, de primers e misturas de sondas.



**Figura 3: Configuração sugerida para rotor para cada ensaio com o kit *ipsogen 24 sample JAK2 MutaQuant*. PC-VF: Controlo positivo V617F; NC-VF: Controlo negativo V617F; M-VF: Padrões V617F; M-WT: Padrões de tipo selvagem; S: Amostra de ADN; H<sub>2</sub>O: controlo de água.**

**Nota:** Tenha o cuidado de colocar sempre uma amostra a ser testada na posição 1 do rotor. Caso contrário, durante a fase de calibragem, o instrumento não realizará a calibragem e podem ser adquiridos dados de fluorescência incorretos.

Preencha todas as outras posições com tubos vazios.

### qPCR em instrumentos Rotor-Gene Q com rotor de 72 tubos

**Nota:** Realizar todos os passos no gelo.

#### Procedimento

1. **Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.**
2. **Prepare a seguinte mistura de qPCR de acordo com o número de amostras a processar.**



Todas as concentrações são o volume final da reação.

As tabelas 3 e 4 descrevem o esquema de pipetagem para a preparação de uma mistura de reagentes, calculada para alcançar um volume de reação final de 25  $\mu$ l. Pode ser preparada uma pré-mistura de acordo com o número de reações, usando o mesmo primer e mistura de sondas (PPM-VF ou PPM-WT). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

**Tabela 3: Preparação da mistura de qPCR**

<b>Componente</b>	<b>1 reação (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Pré-mistura V617F 30 + 1 reações (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentração final</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Primers e mistura de sondas, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	6,5	201,5	–
Amostra (a acrescentar ao passo 4)	5,0	5 cada	–
Volume total	25,0	25 cada	–

**Tabela 4: Preparação da mistura de qPCR**

<b>Componente</b>	<b>1 reação (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Pré-mistura WT 30 + 1 reações (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentração final</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Primers e mistura de sondas, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	6,5	201,5	–
Amostra (a acrescentar ao passo 4)	5,0	5 cada	–
Volume total	25,0	25 cada	–

- 3. Distribua 20  $\mu$ l da pré-mistura de qPCR (VF ou WT) por tubo.**
- 4. Adicione 5  $\mu$ l de material a ser quantificado (25 ng de ADN genómico ou controlo) no respetivo tubo (volume total 25  $\mu$ l).**
- 5. Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.**
- 6. Coloque os tubos no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante.**
- 7. Programe o instrumento Rotor-Gene Q com o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 5.**

**Tabela 5: Perfil de temperatura**

<b>Modo de análise</b>	Quantificação
<b>Hold</b>	Temperatura: 50 graus Tempo: 2 min
<b>Hold 2</b>	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min
<b>Cycling</b>	50 vezes 95 °C durante 15 segundos 62 °C durante 1 minuto com aquisição de fluorescência da FAM em Channel Green: Single (simples)

- 8. Para instrumentos Rotor-Gene Q, selecione "Slope Correct" para a análise. Recomendamos que o limiar seja definido para 0,03. Inicie o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 5.**

## Protocolo: qPCR em instrumento ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e LightCycler 480

Usando equipamento de qPCR de placas de 96 poços, recomendamos a realização de todas as medições em duplicado, conforme indicado na tabela 6.

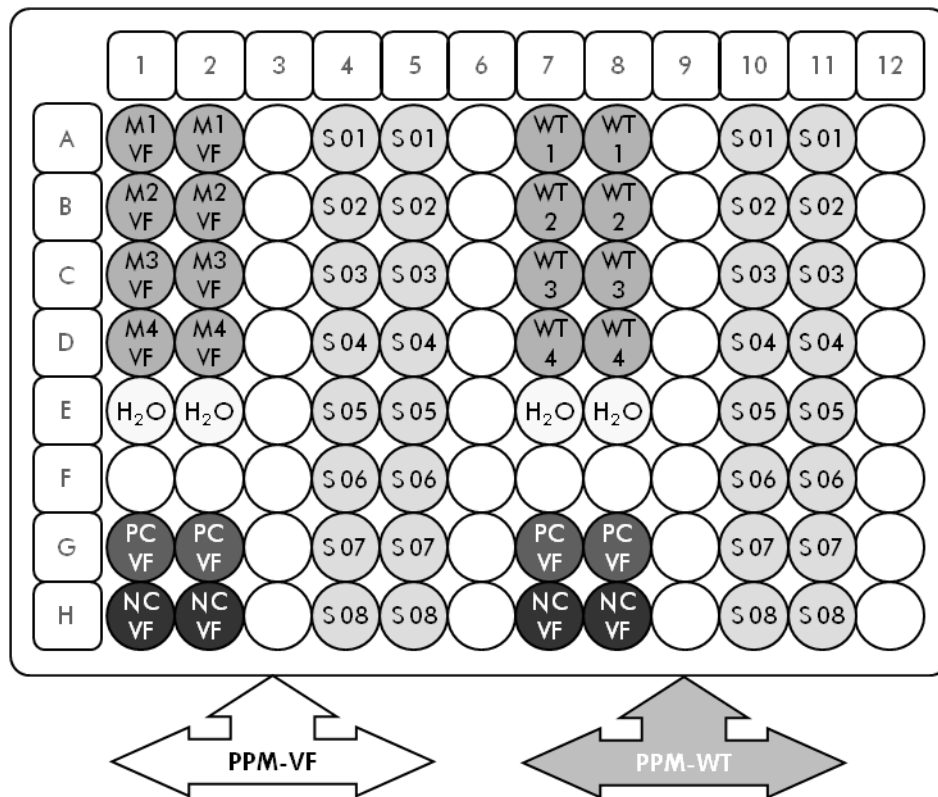
**Tabela 6: Número de reações usando equipamento de qPCR de placas de 96 poços**

<b>Amostras</b>	<b>Reações</b>
<b>Com os primers e mistura de sondas JAK2 V617F (PPM-VF)</b>	
4 padrões M-VF	8 reações, cada uma testada em duplicado
n amostras de ADN	n x 2 reações
2 controlos de ADN	4 reações: PC-VF e NC-VF, cada uma testada em duplicado
Controlo de água	2 reações
<b>Com os primers de tipo selvagem JAK2 e mistura de sondas (PPM-WT)</b>	
4 padrões de tipo selvagem	8 reações, cada uma testada em duplicado
n amostras de ADN	n x 2 reações
2 controlos de ADN	4 reações: PC-VF e NC-VF, cada uma testada em duplicado
Controlo de água	2 reações

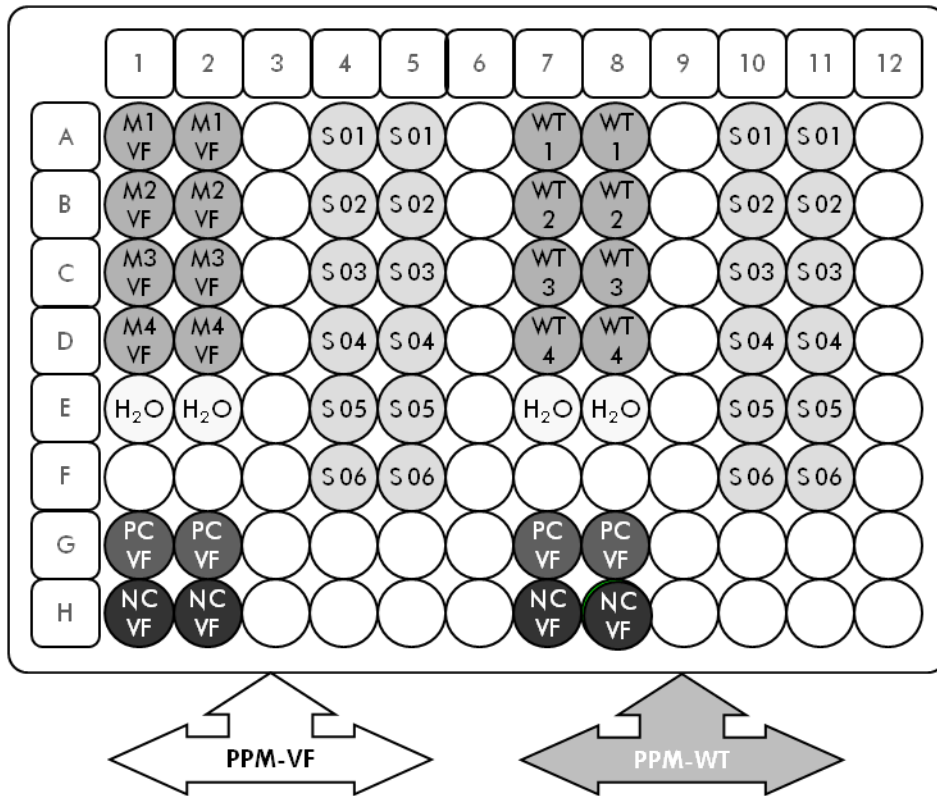
### Processamento de amostras em instrumento ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e LightCycler 480

Recomendamos o teste de 8 amostras de ADN com kit de 24 reações (n.º de catálogo 673523) e de, pelo menos, 6 amostras de ADN com kit de 12 reações (n.º de catálogo 673522) no mesmo ensaio para otimizar a utilização de padrões, de primers e misturas de sondas.

O esquema de placas na figura 4 apresenta o exemplo de um ensaio deste tipo com o kit de 24 reações (n.º de catálogo 673523) e a figura 5 apresenta o exemplo de um ensaio deste tipo com o kit de 12 reações (n.º de catálogo 673522).



**Figura 4: Configuração da placa sugerida para um ensaio com o kit de 24 reações (n.º de catálogo 673523).** PC-VF: Controlo positivo V617F; NC-VF: Controlo negativo V617F; M-VF: Padrões V617F; M-WT: Padrões de tipo selvagem; S: Amostra de ADN; H<sub>2</sub>O: controlo de água.



**Figura 5: Configuração da placa sugerida para um ensaio com o kit de 12 reações (n.º de catálogo 673522). PC-VF: Controlo positivo V617F; NC-VF: Controlo negativo V617F; M-VF: Padrões V617F; M-WT: Padrões de tipo selvagem; S: Amostra de ADN; H<sub>2</sub>O: controlo de água.**

### qPCR em instrumento ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e LightCycler 480

**Nota:** Realizar todos os passos no gelo.

#### Procedimento

1. **Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.**
2. **Prepare a seguinte mistura de qPCR de acordo com o número de amostras a processar.**

Todas as concentrações são o volume final da reação.

As tabelas 7 e 8 descrevem o esquema de pipetagem para a preparação de uma mistura de reagentes, calculada para alcançar um volume de reação final de 25  $\mu$ l. Pode ser preparada uma pré-mistura de acordo com o número de reações, usando o mesmo primer e mistura de sondas (PPM-VF ou PPM-WT). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

**Tabela 7: Preparação da mistura de qPCR**

<b>Componente</b>	<b>Pré-mistura V617F</b>			<b>Concentração final</b>
	<b>1 reação (μl)</b>	<b>26 + 1 reações (μl)</b>	<b>30 + 1 reações (μl)</b>	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primers e mistura de sondas, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	6,5	175,5	201,5	–
Amostra (a acrescentar ao passo 4)	5,0	5 cada	5 cada	–
Volume total	25,0	25 cada	25 cada	–

**Tabela 8: Preparação da mistura de qPCR**

Componente	Pré-mistura WT			Concentração final
	1 reação (µl)	26 + 1 reações (µl)	30 + 1 reações (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primers e mistura de sondas, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	6,5	175,5	201,5	–
Amostra (a acrescentar ao passo 4)	5,0	5 cada	5 cada	–
Volume total	25,0	25 cada	25 cada	–

3. Distribua 20 µl da pré-mistura de qPCR (VF ou WT) por poço.
4. Adicione 5 µl de material a ser quantificado (25 ng de ADN genómico ou controlo) no respetivo poço (volume total 25 µl).
5. Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.
6. Feche a placa e centrifugue brevemente (300 x g, aproximadamente 10 segundos).
7. Coloque a placa no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante.
8. Programe o termociclador com o programa de termociclagem e regule o instrumento para a aquisição de sonda fluorescente FAM duplamente marcada, tal como indicado na tabela 9 para o instrumento ABI PRISM 7900HT SDS e Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ou tabela 10 para o LightCycler 480.



**Tabela 9: Perfil de temperatura para ABI PRISM 7900HT SDS e Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**

<b>Modo de análise</b>	Curvas-padrão - Quantificação absoluta
<b>Hold</b>	Temperatura: 50 °C Tempo: 2 min
<b>Hold 2</b>	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min
<b>Cycling</b>	50 vezes 95 °C durante 15 segundos 63 °C durante 1 minuto e 30 segundos com aquisição de fluorescência da FAM; corante de extinção: TAMRA

**Tabela 10: Perfil de temperatura para o instrumento LightCycler 480**

<b>Modo de análise</b>	Quantificação absoluta ("Abs Quant")
<b>Formatos de detecção</b>	Selecione "Simple Probe" (amostra simples) na janela de formatos de detecção
<b>Hold</b>	Temperatura: 50 °C Tempo: 2 min
<b>Hold 2</b>	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min
<b>Cycling</b>	50 vezes 95 °C durante 15 segundos 63 °C durante 1 minuto e 30 segundos com aquisição de fluorescência da FAM correspondendo a (483–533 nm) para LC versão 01 e (465–510 nm) LC versão 02:

- 9. Para ABI PRISM 7900HT e Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System siga o passo 9a. Para o instrumento LightCycler 480, siga o passo 9b.**

- 9a. ABI PRISM 7900HT e Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System:** Recomendamos que o limiar seja definido em 0,1. Inicie o programa de ciclagem, conforme indicado na tabela 9.
- 9b. LightCycler 480:** Recomendamos um modo de análise do ponto de ajuste com um fundo a 2,0 e limiar a 2,0. Inicie o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 10.

## Protocolo: qPCR no instrumento LightCycler 1.2

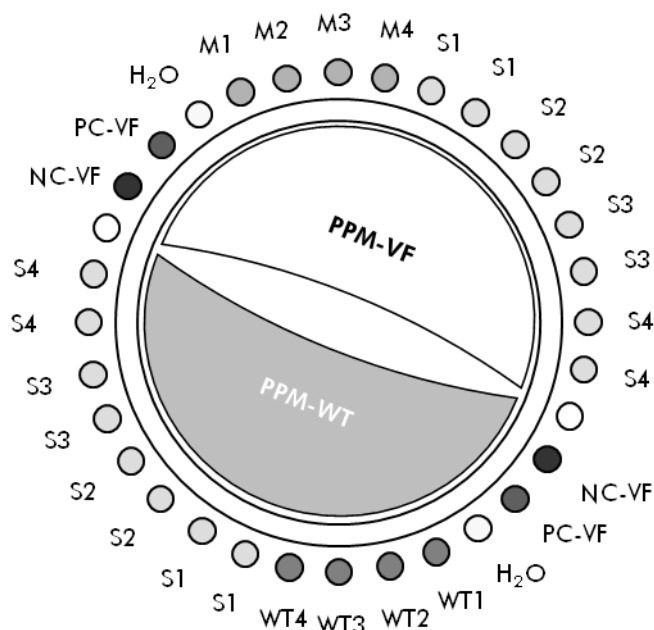
Utilizando instrumentos capilares, recomendamos a medição das amostras e dos controlos em duplicado apenas uma vez, conforme indicado na tabela 11.

**Tabela 11: Número de reações para o instrumento LightCycler 1.2**

<b>Amostras</b>	<b>Reações</b>
<b>Com os primers e mistura de sondas JAK2 V617F (PPM-VF)</b>	
4 padrões M-VF	4 reações, cada uma testada uma vez
n amostras de ADN	n x 2 reações
2 controlos de ADN	2 reações: PC-VF e NC-VF, cada uma testada uma vez
Controlo de água	1 reação
<b>Com os primers de tipo selvagem JAK2 e mistura de sondas (PPM-WT)</b>	
4 padrões de tipo selvagem	4 reações, cada uma testada uma vez
n amostras de ADN	n x 2 reações
2 controlos de ADN	2 reações: PC-VF e NC-VF, cada uma testada uma vez
Controlo de água	1 reação

### Processamento de amostras no instrumento LightCycler 1.2

Recomendamos o teste de 4 amostras de ADN no mesmo ensaio para otimizar a utilização de padrões, de primers e misturas de sondas. O esquema capilar na figura 6 apresenta o exemplo de um ensaio deste tipo.



**Figura 6: Configuração sugerida para rotor para cada ensaio com o kit ipsogen JAK2 MutaQuant.** PC-VF: Controlo positivo V617F; NC-VF: Controlo negativo V617F; M-VF: Padrões V617F; M-WT: Padrões de tipo selvagem; S: Amostra de ADN; H<sub>2</sub>O: controlo de água.

## qPCR no instrumento LightCycler 1.2

**Nota:** Devido aos requisitos tecnológicos particulares, os ensaios LightCycler têm de ser realizados usando reagentes específicos. Recomendamos a utilização de LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe e a observação e seguimento das instruções do fabricante para a preparação da Master Mix 5x.

**Nota:** Realizar todos os passos no gelo.

## Procedimento

- 1. Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.**
- 2. Prepare a seguinte mistura de qPCR de acordo com o número de amostras a processar.**

Todas as concentrações são o volume final da reação.

As tabelas 12 e 13 descrevem o esquema de pipetagem para a preparação de uma mistura de reagentes, calculada para alcançar um volume de reação final de 20 µl. Pode ser preparada uma pré-mistura de acordo com o número de reações, usando o mesmo primer e mistura de sondas (PPM-VF ou PPM-WT). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

**Tabela 12: Preparação da mistura de qPCR**

<b>Componente</b>	<b>1 reação (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Pré-mistura V617F 15 + 1 reações (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentração final</b>
LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> HybProbe Mix, 5x recém-preparada	4,0	64,0	1x
Primers e mistura de sondas, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	10,2	163,2	–
Amostra (a acrescentar ao passo 4)	5,0	5 cada	–
Volume total	20,0	20 cada	–

**Tabela 13: Preparação da mistura de qPCR**

<b>Componente</b>	<b>1 reação (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Pré-mistura WT 15 + 1 reações (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentração final</b>
LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> HybProbe Mix, 5x recém-preparada	4,0	64,0	1x
Primers e mistura de sondas, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	10,2	163,2	–
Amostra (a acrescentar ao passo 4)	5,0	5 cada	–
Volume total	20,0	20 cada	–

- 3. Distribua 15  $\mu$ l da pré-mistura de qPCR (VF ou WT) por capilar.**
- 4. Adicione 5  $\mu$ l de material a ser quantificado (25 ng de ADN genómico ou controlo) no respetivo tubo (volume total 20  $\mu$ l).**
- 5. Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.**
- 6. Coloque os capilares nos adaptadores fornecidos com o aparelho e centrifugue por breves instantes (700 x g, aproximadamente 10 segundos).**
- 7. Carregue os capilares no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante.**
- 8. Programe o instrumento LightCycler 1.2 com o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 14.**

**Tabela 14: Perfil de temperatura**

<b>Modo de análise</b>	Quantificação
<b>Hold 1</b>	Temperatura: 55 °C Tempo: 2 min Rampa: 20
<b>Hold 2</b>	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min Rampa: 20
<b>Cycling</b>	50 vezes 95 °C durante 15 segundos; rampa: 20 66 °C durante 1 minuto; rampa: 20; com aquisição de fluorescência da FAM: Single (simples)

9. Para o LightCycler 1.2, são recomendados o F1/F2 e o modo “2<sup>nd</sup> derivative analysis” (2.º modo de análise derivativa). Inicie o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 14.

# Interpretação dos resultados

## Princípio de análise de dados

Os dados para o ciclo de limiar ( $C_T$ ) e valores do ponto de passagem ( $C_P$ ) podem ser exportados do instrumento qPCR e colados num ficheiro Excel® para análise. Estes valores podem depois ser usados para calcular o valor médio para  $C_P$  e  $C_T$  e os valores médios  $C_T$  padrão podem ser analisados para obter uma curva-padrão para os padrões de tipo selvagem e V617F, usando a seguinte equação e a tabela 15.

$y = C_P$  médio;  $x = \log_{10} \text{CN}$  em que CN = número de cópias do gene na amostra de  $5 \mu\text{l}$

**Tabela 15: Dados quantitativos para os padrões de tipo selvagem e V617F**

Padrão	Número de cópias (CN)	$\log_{10} \text{CN}$
M1-VF	$5 \times 10^1 \text{ VF}$	1,7
M2-VF	$5 \times 10^2 \text{ VF}$	2,7
M3-VF	$5 \times 10^3 \text{ VF}$	3,7
M4-VF	$5 \times 10^4 \text{ VF}$	4,7
WT-1	$5 \times 10^1 \text{ WT}$	1,7
WT-2	$5 \times 10^2 \text{ WT}$	2,7
WT-3	$5 \times 10^3 \text{ WT}$	3,7
WT-4	$5 \times 10^4 \text{ WT}$	4,7

**Nota:** Cada utilizador deve medir a sua própria reprodutibilidade no seu laboratório.

## Curva-padrão e critérios de qualidade

As figuras 7 e 9 mostram exemplos dos resultados obtidos com o kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant e as figuras 8 e 10 apresentam um exemplo da curva teórica calculada em 4 diluições do padrão.



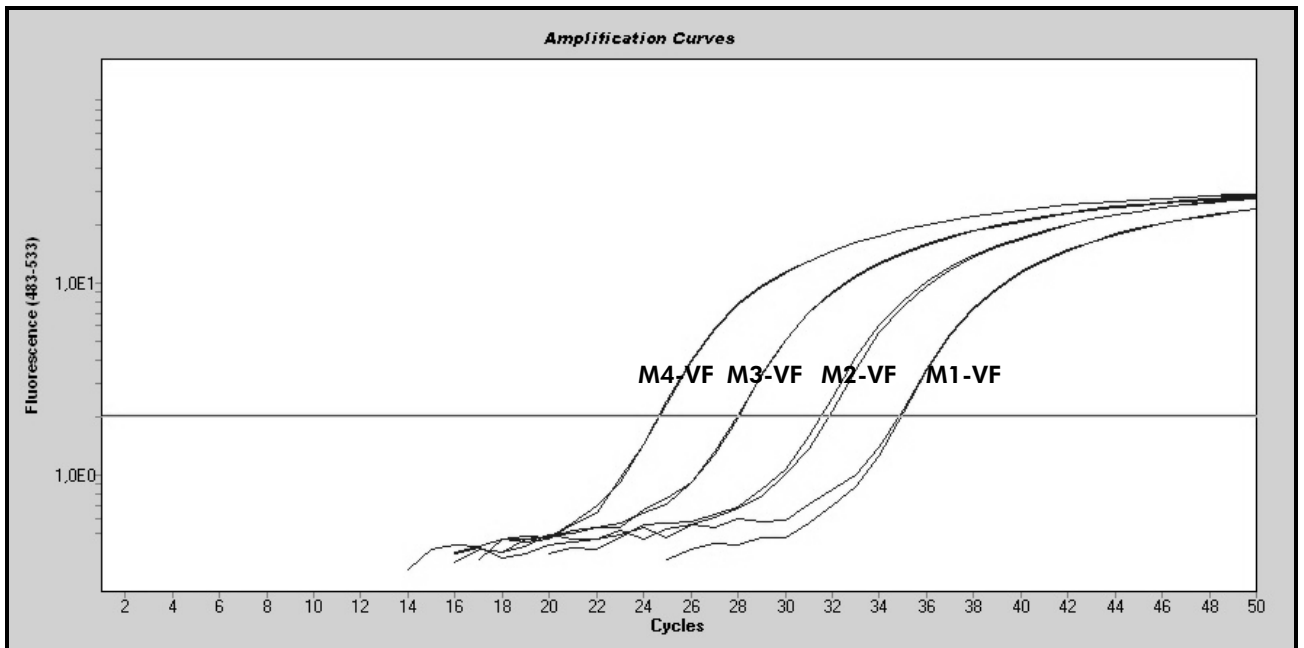


Figura 7: Gráfico de amplificação de  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$  e  $5 \times 10^4$  cópias do plasmídeo JAK2 V617F (controles M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF, respetivamente).

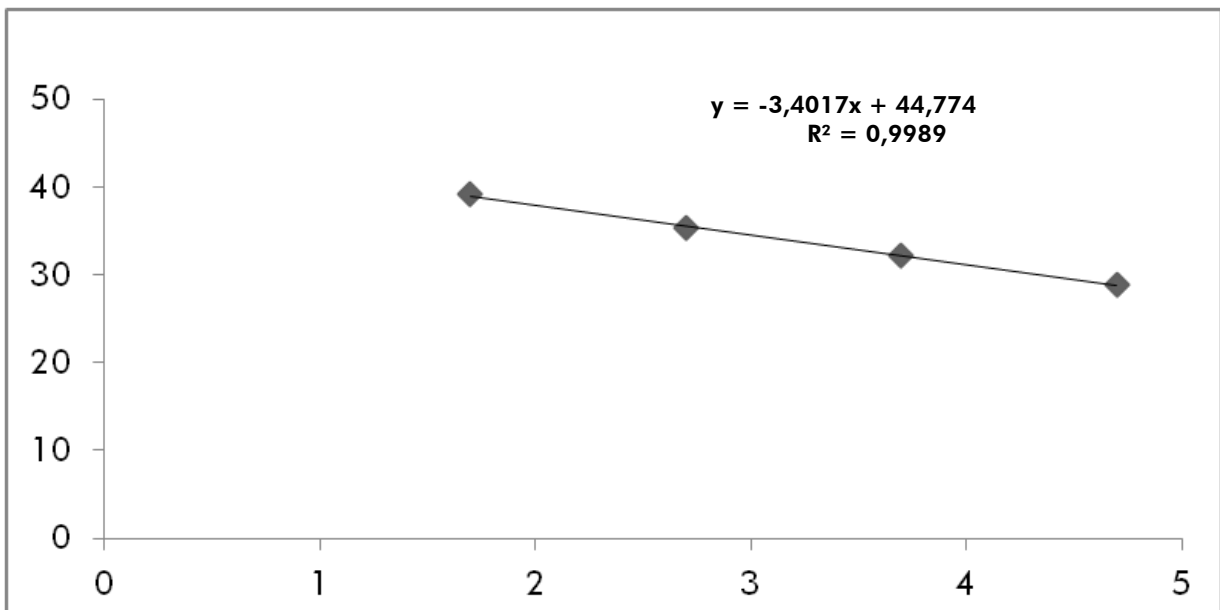
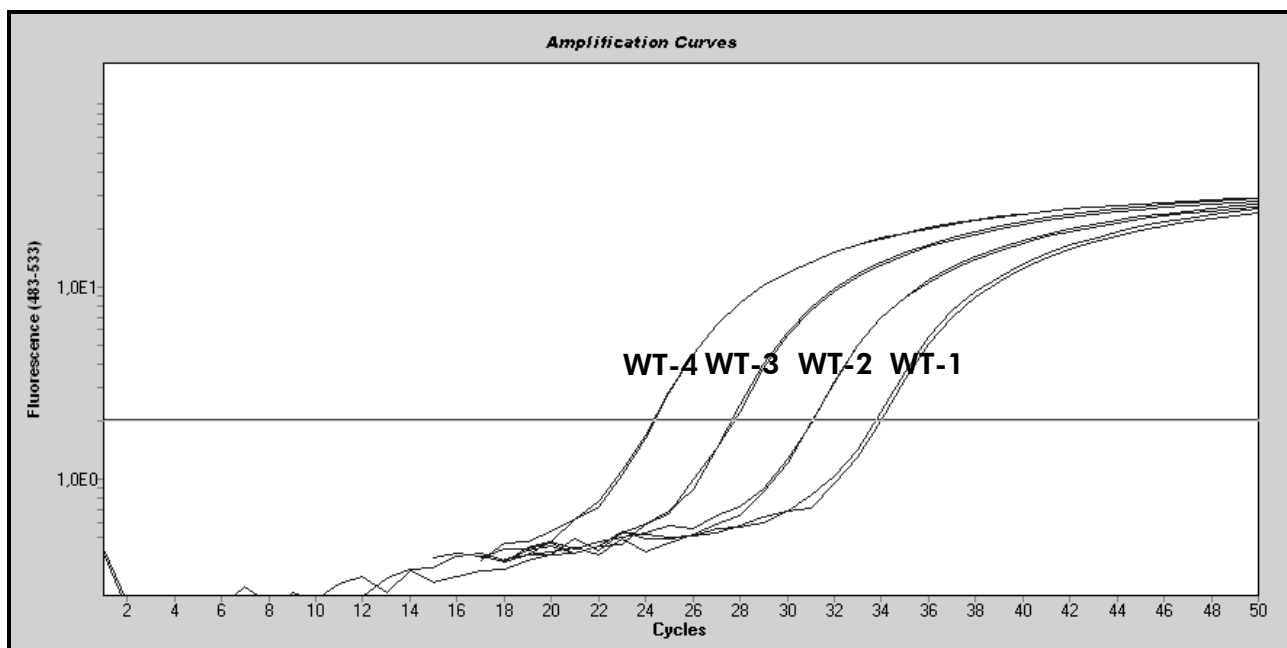
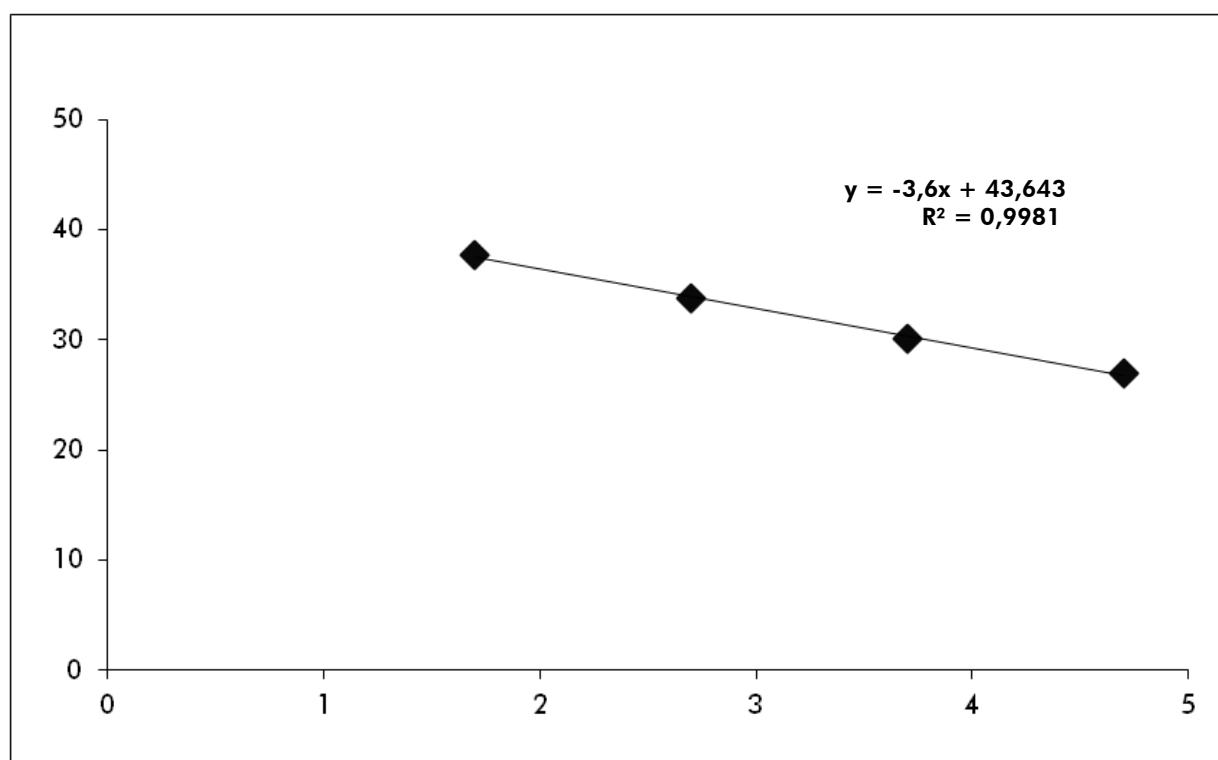


Figura 8: Curva-padrão para JAK2 V617F.



**Figura 9: Gráfico de amplificação de  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$  e  $5 \times 10^4$  cópias do plasmídeo de tipo selvagem JAK2 (controlos WT-1, WT-2, WT-3 e WT-4, respetivamente).**



**Figura 10: Curva-padrão para tipo selvagem JAK2.**

Como os padrões são diluições multiplicadas por dez, o declive teórico da curva é  $-3,32$ . Um declive entre  $-3,0$  e  $-3,9$  é aceitável desde que  $R^2$  seja

>0,95 (12). Contudo, é desejável um valor para  $R^2 > 0,98$  para resultados precisos (13).

As equações de curva-padrão podem ser usadas para calcular os números de cópias V617F e WT  $\log_{10}$  nas amostras desconhecidas.

A equação da curva-padrão V617F deve ser usada para transformar médias de valor em bruto  $C_P / C_T$  (obtidos com PPM-VF) para as amostras desconhecidas e de controlo em números de cópias JAK2 V617F ( $CN_{V617F}$ ).

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(C_{pV617F} \text{ média} - \text{intersecção da curva-padrão}_{V617F})}{\text{Declive da curva-padrão}_{V617F}}$$

A equação da curva-padrão de tipo selvagem deve ser utilizada para transformar os valores médios de  $C_P / C_T$  (obtidos com PPM-WT) para as amostras desconhecidas e de controlo em números de cópias de tipo selvagem JAK2 ( $CN_{WT}$ ).

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(C_{pWT} \text{ média} - \text{intersecção da curva-padrão}_{WT})}{\text{Declive da curva-padrão}_{WT}}$$

### **Expressão dos resultados**

Os resultados são relativos a 25 ng do ADN genómico total e devem ser expressos como percentagem de JAK2 V617F da seguinte forma:

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

### **Reprodutibilidade entre replicados**

Os dados obtidos devem ser consistentes entre duplicados.

### **Controlos positivos e negativos**

O controlo positivo ou PC-VF deve dar uma percentagem JAK2 V617F superior a 99,9%.

O controlo negativo ou NC-VF dever dar uma percentagem JAK2 V617F inferior a 0,1%.

Se estes controlos não funcionarem corretamente, consultar a “Guia de resolução de problemas”, página 36, para encontrar uma solução.

### **Controlos da água**

Os controlos negativos devem dar zero CN para a deteção de tipo selvagem JAK2 V617F e JAK2.

Um controlo de água positivo resulta de uma contaminação cruzada. Ver “Guia de resolução de problemas”, abaixo, para encontrar uma solução.

### **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](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa ter sobre as informações e protocolo constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para informações de contacto, consulte “Informações de contacto”, página 45).

---

### **Comentários e sugestões**

---

#### **A curva-padrão para o tipo selvagem ou V617F não é linear**

Inversão do frasco, inversão durante a distribuição, contaminação cruzada, degradação parcial do padrão, reagente RQPCR, amplificação não específica ou erro de programa PCR

Verifique o esquema de pipetagem e a configuração da reação.

Guarde o kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant entre –15 e –30 °C e mantenha os primers e misturas de sondas protegidos da luz. Ver “Armazenamento e manuseamento de reagente”, página 13.

Evite congelar e descongelar repetidamente.

#### **Nenhum sinal ou sinal baixo para um padrão**

Padrão não distribuído ou utilização da mesma mistura PPM

Verifique o esquema de pipetagem e a configuração da reação.

Repita a corrida da PCR.

## Comentários e sugestões

---

### O controlo negativo (H<sub>2</sub>O) é positivo

Contaminação cruzada, contaminação do reagente, erro do instrumento, inversão do poço ou do capilar ou degradação da amostra

Substitua todos os reagentes críticos.

As amostras, os componentes do kit e os consumíveis devem sempre ser tratados de acordo com as práticas normalmente aceites para prevenir a contaminação por transporte.

Mantenha os primers e misturas de sondas protegidos da luz.

Verifique se há falsos positivos nas curvas de fluorescência.

### Sem sinal, mesmo no controlo-padrão

a) Canal de deteção incorreto selecionado

Defina o canal para F1/F2 ou 530 nm/640 nm.

b) Erro de pipetagem ou reagentes ausentes

Verifique o esquema de pipetagem e a configuração da reação.

Repita a corrida da PCR.

c) Sem programa de aquisição de dados

Verifique o programa de ciclo.

Selecione o modo de aquisição "single" (simples) no final de cada segmento de hibridização do programa PCR.

### Sinal ausente ou baixo nas amostras, mas os controlos-padrão estão OK

Efeitos inibidores do material da amostra provocados por uma purificação insuficiente

Antes de iniciar, verifique sempre a qualidade do ADN (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) e a concentração.

Repita a preparação do ADN.

### Intensidade da fluorescência demasiado baixa

- a) Armazenamento inapropriado dos componentes do kit
- Reagentes de alíquotas para armazenamento.
- Guarde o kit *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* entre  $-15$  e  $-30$  °C e mantenha os primers e misturas de sondas protegidos da luz. Ver "Armazenamento e manuseamento de reagente", página 13.
- Evite congelar e descongelar repetidamente.
- b) Quantidade inicial muito baixa de ADN alvo
- Verifique a quantidade da amostra de ADN.
- Nota:** Dependendo do método de preparação de ADN selecionado, podem verificar-se efeitos inibidores.

### Os controlos negativos são positivos

- Contaminação por transporte
- Substitua todos os reagentes críticos.
- Repita o ensaio com alíquotas novas de todos os reagentes.
- As amostras, os componentes do kit e os consumíveis devem sempre ser tratados de acordo com as práticas normalmente aceites para prevenir a contaminação por transporte.

### A intensidade de fluorescência varia

- a) Erro de pipetagem
- Agite no vórtex e centrifugue todo o reagente após a descongelação.
- A variabilidade do LightCycler provocada pelo designado "erro de pipetagem" pode ser reduzida analisando dados no modo F1/F2 ou 530 nm/640 nm.

## Comentários e sugestões

---

- |  |   |
|--|---|
| b) Centrifugação insuficiente na placa, tubos ou capilares ou a mistura preparada de PCR pode continuar a estar no vaso superior do capilar ou poderá estar presa uma bolha de ar na extremidade do capilar. | Centrifugue sempre os capilares carregados com mistura de reação, conforme descrito no manual de funcionamento específico do instrumento. |
| c) A superfície externa da ponta do capilar está suja  | Use sempre luvas quando manusear os capilares.  |

### **Sinal de controlos de tipo selvagem ou positivo V617F usando PPM recíprocos**

- |  |  |
|--|--|
| Contaminação cruzada, contaminação do reagente ou do poço ou capilar | Substitua todos os reagentes críticos.<br>Repita o ensaio com alíquotas novas de todos os reagentes.<br><br>As amostras, os componentes do kit e os consumíveis devem sempre ser tratados de acordo com as práticas normalmente aceites para prevenir a contaminação por transporte.<br><br>Verifique o esquema de pipetagem e a configuração da reação. |
|--|--|

### **Deteção invertida do controlo positivo**

- |  |  |
|--|--|
| Inversão distribuída de PPM no poço ou capilar ou na pré-mistura | Verifique o esquema de pipetagem e a configuração da reação. |
|--|--|

### **Sem sinal num controlo positivo ou em ambos**

- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| PPM ou ADN de controlo ausente | Verifique o esquema de pipetagem e a configuração da reação. |
|--------------------------------|--|

### **Fundo elevado**

- |                              |   |
|------------------------------|---|
| Branqueamento por fluoróforo | Guarde e manuseie a sonda protegida da luz. |
|------------------------------|---|

### **Má reprodutibilidade para as amostras duplicadas**

- |   |  |
|---|--|
| Erro de pipetagem ou contaminação cruzada | Verifique o esquema de pipetagem e a configuração da reação. |
|---|--|

## Controlo da qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Total, certificado pela norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do Kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant são testados quanto às especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto. Certificados de análise estão disponíveis quando solicitado através de [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Limitações

Os utilizadores devem dispor de formação e estar familiarizados com esta tecnologia antes da utilização do dispositivo. Este kit deve ser utilizado observando as instruções constantes deste manual, em conjunto com um instrumento validado indicado em “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 11.

Quaisquer resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados juntamente com outros resultados clínicos ou laboratoriais. É da responsabilidade do utilizador validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório que não estejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Deve prestar-se atenção aos prazos de validade impressos na caixa e nas etiquetas de todos os componentes. Não utilize componentes cujo prazo de validade tenha expirado.



# Características de desempenho

## Estudos não clínicos

### Precisão

Foi realizado um estudo de precisão com 12 amostras de ADN extraídas de linhas de células correspondentes a diferentes cargas de alelos JAK2 V617F. Foi realizado um total de 80 medições em cada amostra, com 3 lotes diferentes do kit *ipsogen JAK2 MutaQuant*. Este estudo de precisão usou um Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Os dados analíticos estão resumidos na tabela 15.

**Tabela 15: Dados da precisão de amostras de ADN**

Amostra	JAK2 V617F teórico (%)	n*	Média (%)	CV (%)	Percentil	
					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

\* Foram excluídos os valores atípicos. Estes foram definidos como valores menores que o quartil inferior menos 3 vezes o intervalo interquartis, ou maiores do que o quartil superior mais 3 vezes o intervalo interquartis numa caixa com bigodes ("box-and-whiskers").

n = número de amostras validadas; CV = coeficiente de variação global.

## Limite de branco e limite de detecção

O nível de fundo ou de branco (LOB) foi determinado em amostras negativas (8 amostras, 76 medições). Verificou-se que era de 0,014%.

O limite de detecção (LOD) foi determinado através de amostras positivas conhecidas, mas com baixa expressão (7 amostras, 68 medições). Verificou-se que era de 0,061%, com um valor superior do intervalo de confiança de 90% em 0,091%.

A sensibilidade ideal pode ser obtida em amostras com, pelo menos, 10 000 cópias do gene JAK2 (de tipo selvagem ou mutação V617F).

Os dados da quantificação devem ser apresentados da seguinte forma:

- JAK2 V617F  $\leq 0,014\%$  pode ser interpretado como não tendo sido detetada a mutação JAK2 V617F.
- JAK2 V617F é  $>0,014\%$  mas  $<0,091\%$  pode ser interpretado como resultado inconclusivo.
- JAK2 V617F  $\geq 0,091\%$  pode ser interpretado como um resultado positivo e como tendo sido detetada a mutação JAK2 V617F.

## Linearidade

Os estudos de linearidade foram realizados em 12 amostras, cada uma obtida a partir de uma diferente mistura de ADN extraído de linhas de células positivas e negativas para a mutação JAK2 V617F. Cada amostra foi testada 5 vezes. Os dados deste estudo mostraram que o kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* deu resultados lineares ao longo da gama dinâmica.

## Estudos clínicos

Foi extraído ADN de sangue ou medula óssea oriundo de amostras de 87 doentes e analisado com o *ipsogen JAK2 MutaQuant*. Além disso, a percentagem de mutações JAK2 V617F foi quantificada e comparada com resultados dos testes de rastreio obtidos com o kit *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ* (n.º de catálogo 673223). Os dados obtidos são mostrados na tabela 16.

**Tabela 16: Tabela de contingência que apresenta a concordância entre os resultados obtidos com o kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* e o kit *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ***

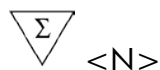
		Resultados do kit <i>ipsogen JAK2 MutaScreen EZ</i>			
		Mutação detetada	Resultado inconclusivo	Mutação não detetada	n
Resultados do kit <i>ipsogen JAK2 MutaQuant</i>	Mutação detetada	40	2	7	49
	Resultado inconclusivo	0	0	21	21
	Mutação não detetada	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Concordância positiva	100% (intervalo de confiança de 95%: 91%, 100%)				
Concordância negativa	71% (intervalo de confiança de 95%: 51%, 85%)				
Concordância geral	89% (intervalo de confiança de 95%: 79%, 95%)				

## Referências

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

Os símbolos seguintes podem aparecer na embalagem e na rotulagem:



Contém reagentes suficientes para <N> reações



Prazo de validade



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Número de catálogo



Número do lote



Número do material



Número do item de comércio mundial



Limites de temperatura



Fabricante



Consultar as instruções de utilização

## Informações de contacto

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

## Informações para encomenda

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Para 12 reações: Controlo de gene de tipo selvagem JAK2, gene de controlo JAK2 V617F, primers e mistura de sondas PPM-WT, primers e mistura de sondas PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Para 24 reações: Controlo de gene de tipo selvagem JAK2, gene de controlo JAK2 V617F, primers e mistura de sondas PPM-WT, primers e mistura de sondas PPM-VF	673523
<b>Rotor-Gene Q MDx - para análise PCR em tempo real validada para IVD em aplicações clínicas</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de <i>melting</i> com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra técnica; instalação e formação não incluídas.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de <i>melting</i> com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra técnica; instalação e formação incluídas.	9002033

Para informações atualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respetivo manual do kit QIAGEN ou do utilizador. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser pedidos 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 usados para o fabrico de produtos comerciais sem a aprovação expressa por escrito da QIAGEN.

A informação constante do presente documento pode ser alterada sem aviso prévio. A QIAGEN não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros contidos no presente documento. Considera-se este documento como completo e rigoroso no momento da sua publicação. Em caso algum poderá a QIAGEN ser considerada 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 as utilizações daí decorrentes estão protegidas por direitos de patente, incluindo a patente europeia EP1692281, as patentes dos EUA 7,429,456 e 7,781,199, os pedidos de patente 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 JAK2 V617F. A QIAGEN desenvolve programas de licenciamento específico para essas utilizações. Contacte o nosso departamento jurídico através de [jak2licenses@qiagen.com](mailto:jak2licenses@qiagen.com).

Marcas registadas: 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).

### Acordo de licença limitada

A utilização deste produto equivale ao acordo, por parte de qualquer comprador ou utilizador do kit *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* com os seguintes termos:

1. o kit *ipsogen*JAK2 *MutaQuant* pode ser usado somente em conformidade com o *Manual do kit ipsogen JAK2 MutaQuant* e apenas para utilização com os componentes contidos no kit. A QIAGEN não concede nenhuma licença ao abrigo de qualquer da sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito no *Manual do kit ipsogen JAK2 MutaQuant* e quaisquer protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não emite qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados ou ser objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que qualquer outro tome medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de Licença Limitada em qualquer tribunal e irá recuperar todos os seus custos legais e de investigação, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir este Acordo de Licença Limitada ou qualquer dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN. Todos os direitos reservados.

---

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

