

Septiembre de 2017

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



Para uso con el equipo Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

Versión 1

Diagnóstico in vitro cuantitativo



673623



1107956



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA



1107956ES

Contenido

Uso previsto.....	4
Resumen y explicación.....	4
Principio del procedimiento.....	6
Material incluido.....	9
Contenido del kit.....	9
Materiales requeridos pero no suministrados.....	9
Advertencias y precauciones.....	12
Precauciones generales.....	12
Almacenamiento y manipulación de reactivos.....	14
Condiciones de envío.....	14
Condiciones de almacenamiento.....	14
Estabilidad.....	14
Manipulación y almacenamiento de muestras.....	15
Procedimiento.....	15
Extracción y preparación de ADN genómico de muestras de sangre total.....	15
Cualificación y cuantificación del ADN.....	22
Normalización de muestras de ADN genómico.....	22
Protocolo: qPCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.....	23
Interpretación de los resultados.....	32
Guía de resolución de problemas.....	37
Control de calidad.....	39
Limitaciones.....	39
Características de rendimiento.....	40
Límite de blanco.....	40
Límite de detección.....	40
Linealidad.....	41
Repetibilidad y reproducibilidad.....	41
Sustancias interferentes.....	42
Validación clínica y comparación de métodos.....	42

Referencias	44
Símbolos	45
Información de contacto	46
Información para pedidos	47

Uso previsto

El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR es un análisis cuantitativo in vitro diseñado para la detección del alelo JAK2 V617F/G1849T en ADN genómico extraído de sangre total. La prueba se ha concebido como ayuda en el diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas (NMP) en combinación con otros factores clínico-patológicos.

Resumen y explicación

En 2005 se identificó la mutación somática recurrente V617F, que afecta al gen Janus tirosinquinasa 2 (JAK2) (1-4), lo que constituyó un gran avance en la comprensión, la clasificación y el diagnóstico de las NMP. JAK2 es una molécula de señalización intracelular básica para determinadas citocinas, como la eritropoyetina.

La mutación JAK2 V617F se detecta en > 95% de pacientes con policitemia vera (PV), en el 50-60% de pacientes con trombocitemia esencial (TE) y en el 50% de pacientes con mielofibrosis primaria (MFP). También se ha detectado la mutación JAK2 V617F en unos pocos casos de leucemia mielomonocítica crónica, síndrome mielodisplásico (SMD), mastocitosis sistémica y leucemia neutrófila crónica, pero en el 0% de leucemia mieloide crónica (LMC) (5).

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 fenilamina (F) en la posición 617 de la proteína (dominio JH2). La mutación conlleva la activación constitutiva del gen JAK2, la transformación hematopoyética in vitro y la formación de colonias eritroides independientes de la eritropoyetina (EEC) en todos los pacientes con PV y en gran parte de los pacientes con TE y MFP (6). La mutación JAK2 V617F representa un factor clave en la transformación de células hematopoyéticas en NMP, pero todavía no se conocen exactamente los mecanismos patológicos mediante los que, con la misma mutación única, se generan entidades clínicas y biológicas tan diferentes.

Tradicionalmente, el diagnóstico de las NMP se basaba en criterios clínicos, histológicos de médula ósea y citogénicos. El descubrimiento de un marcador molecular específico de estas enfermedades ha simplificado el proceso y ha permitido mejorar la precisión del diagnóstico. La detección de la mutación JAK2 V617F forma parte de los criterios de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2008 para el diagnóstico de las NMP negativas para el BCR ABL (Tabla 1) y la presencia de esta mutación se considera un criterio fundamental para la confirmación del diagnóstico.

Tabla 1. Criterios de la OMS para el diagnóstico de NMP (adaptados de la referencia 7)

Criterios para el diagnóstico de PV	
Principales	1. Hemoglobina (Hgb) > 18,5 g/dl ⁻¹ (hombres) o > 16,5 g/dl ⁻¹ (mujeres) o bien Hgb o hematocrito > percentil 99 del rango de referencia para edad, sexo o altitud de la residencia, o Hgb > 17 g/dl ⁻¹ (hombres) o > 15 g/dl ⁻¹ (mujeres) si se asocia con un incremento sostenido de ≥ 2 g/dl ⁻¹ desde la referencia no atribuible a la corrección de la ferropenia, o Masa eritrocitaria elevada más del 25% por encima del valor medio habitual previsto 2. Presencia de JAK2V617F o una mutación similar
Secundarios	1. Mieloproliferación trilineal en médula ósea 2. Nivel sérico de eritropoyetina anómalo 3. Formación de EEC
Criterios para el diagnóstico de TE	
Principales	1. Recuento de plaquetas ≥ 450 × 10 ⁹ l ⁻¹ 2. Proliferación megacariocítica con morfología grande y madura Escasa o inexistente proliferación granulocítica o eritrocítica 3. Incumplimiento de los criterios de la OMS para LMC, PV, MFP, SMD u otras neoplasias mieloides 4. Manifestación de JAK2V617F u otros marcadores clónicos, o Ausencia de indicios de trombocitosis reactiva
Secundarios	–
Criterios para el diagnóstico de MFP	
Principales	1. Proliferación megacariocítica y atipia acompañadas de fibrosis reticulínica y/o colágena, o En ausencia de fibrosis reticulínica, los cambios megacariocíticos deben ir acompañados de un aumento en la celularidad de la médula ósea, la proliferación granulocítica y, con frecuencia, una disminución de la eritropoyesis (por ejemplo, MFP prefibrótica) 2. Incumplimiento de los criterios de la OMS para LMC, PV, SMD u otras neoplasias mieloides 3. Manifestación de JAK2V617F u otros marcadores clónicos, o Ausencia de indicios de fibrosis reactiva en la médula ósea
Secundarios	1. Leucoeritroblastosis 2. Aumento del nivel sérico de deshidrogenasa láctica 3. Anemia 4. Esplenomegalia palpable

LMC: leucemia mieloide crónica; EEC: colonias eritroides endógenas; TE: trombocitemia esencial; Hgb: hemoglobina; SMD: síndrome mielodisplásico; MFP: mielofibrosis primaria; PV: policitemia vera; OMS: Organización Mundial de la Salud.

Desde 2006, se encuentran disponibles diversos métodos basados fundamentalmente en técnicas de PCR o secuenciación, debido al desarrollo de análisis por parte de los laboratorios para detectar la presencia y cuantificar potencialmente la mutación JAK2V617F. Estas pruebas presentan diferentes rendimientos analíticos, especialmente en lo relativo a la precisión y al nivel de sensibilidad. Es posible que esta diferencia afecte a la necesidad de realizar análisis de médula ósea, al tiempo requerido para establecer un diagnóstico definitivo y, potencialmente, al rendimiento del diagnóstico.

Principio del procedimiento

Se han propuesto varias técnicas diferentes para determinar cuantitativamente la proporción de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en muestras de ADN. Algunas de ellas, como las curvas de fusión y la secuenciación, son únicamente semicuantitativas. Se prefieren los métodos cuantitativos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) en tiempo real debido a su mayor sensibilidad. El uso de un primer específico del SNP permite realizar la amplificación selectiva del alelo mutante (MT) o nativo (WT), fácilmente detectable en un equipo de PCR en tiempo real. Esto proporciona una sensibilidad $<0,1\%$, que coincide con el valor de corte actualmente aceptado de JAC2 del 1% que se utiliza para la positividad clínica. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunos expertos clínicos consideran que la presencia de cualquier carga de JAK2 es clínicamente significativa a la hora de realizar el diagnóstico, de ahí la necesidad de utilizar un método sensible como la qPCR (8). El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR se basa en esta técnica.

El uso de la prueba de qPCR permite la cuantificación precisa de los productos de la PCR durante la fase exponencial del proceso de amplificación de la PCR. Es posible la obtención rápida de datos cuantitativos de la PCR sin necesidad de su procesamiento posterior mediante la detección en tiempo real de señales fluorescentes durante los ciclos de la PCR, o después, reduciendo así considerablemente el riesgo de contaminación con productos de la PCR. Actualmente existen 3 tipos principales de técnicas de qPCR: análisis de qPCR con fluoróforo SYBR® Green I, análisis de qPCR con sondas de hidrólisis y análisis de qPCR con sondas de hibridación.

Este ensayo se centra en el principio de la hidrólisis de oligonucleótidos de la qPCR. Durante la PCR, los primers directos e inversos se hibridan con una secuencia específica. La mezcla contiene otro oligonucleótido enlazado al fluoróforo. Esta sonda, formada por un oligonucleótido marcado con un fluoróforo indicador en el extremo 5' y un supresor sin fluoróforos en sentido descendente en el extremo 3', se hibrida con una secuencia objetivo dentro del producto de la PCR. El análisis de qPCR con sondas de hidrólisis se basa en la actividad de la exonucleasa 5'→3' de la ADN polimerasa *Thermus aquaticus* (*Taq*). Cuando la sonda está intacta, la proximidad del fluoróforo indicador al fluoróforo supresor provoca la supresión de la fluorescencia del indicador debido, principalmente, a la transferencia de energía de tipo Förster.

Durante la PCR, si el objetivo que nos interesa está presente, tanto el primer directo como el inverso se hibridan específicamente con la sonda y la rodean. La actividad de la exonucleasa 5'→3' de la ADN polimerasa escinde la sonda entre el indicador y el supresor solo si los tres oligonucleótidos se hibridan con el objetivo. A continuación, los fragmentos de la sonda se separan del objetivo y continúa la polimerización de la hebra. Se bloquea el extremo 3' de la sonda para evitar la

extensión de la misma durante la PCR (Ilustración 1). Esto ocurre en cada ciclo y no interfiere en la acumulación exponencial del producto.

El aumento de la señal de fluorescencia se detecta únicamente si la secuencia del objetivo es complementaria a los primers y la sonda y, por consiguiente, se amplifica durante la PCR. De acuerdo con estos requisitos, la amplificación no específica no se detecta. Por lo tanto, el aumento de la fluorescencia es directamente proporcional a la amplificación del objetivo durante la PCR.

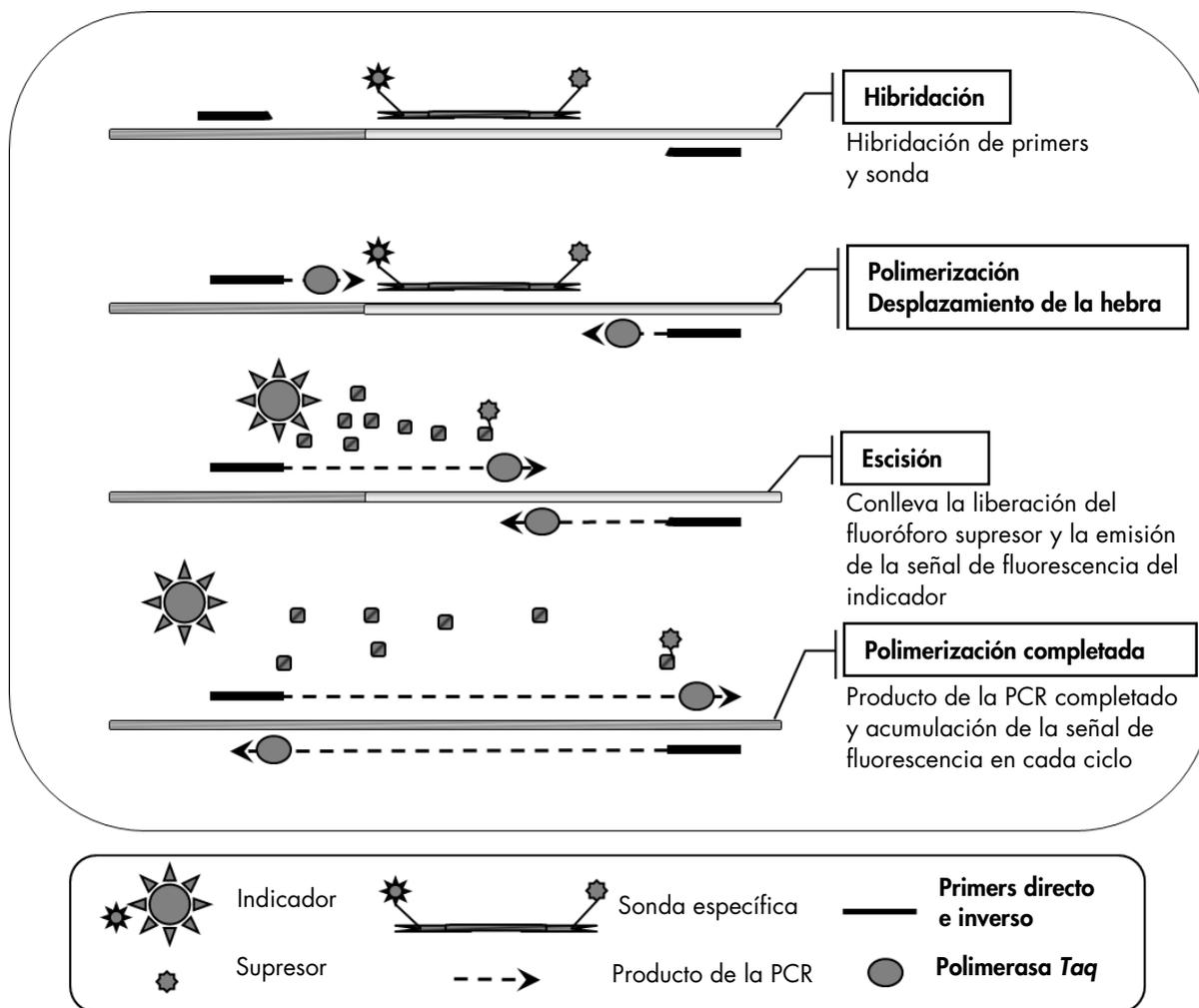


Ilustración 1. Principio de reacción. La tecnología de PCR cuantitativa específica de alelo empleada en este kit de ensayo permite una detección sensible, precisa y muy reproducible de los SNP. Esta técnica se basa en el empleo de primers inversos específicos para los alelos nativos y V617F (8). En la PCR, solo el emparejamiento perfecto entre el primer y el ADN objetivo permite la extensión y la amplificación (consulte la Ilustración 2).

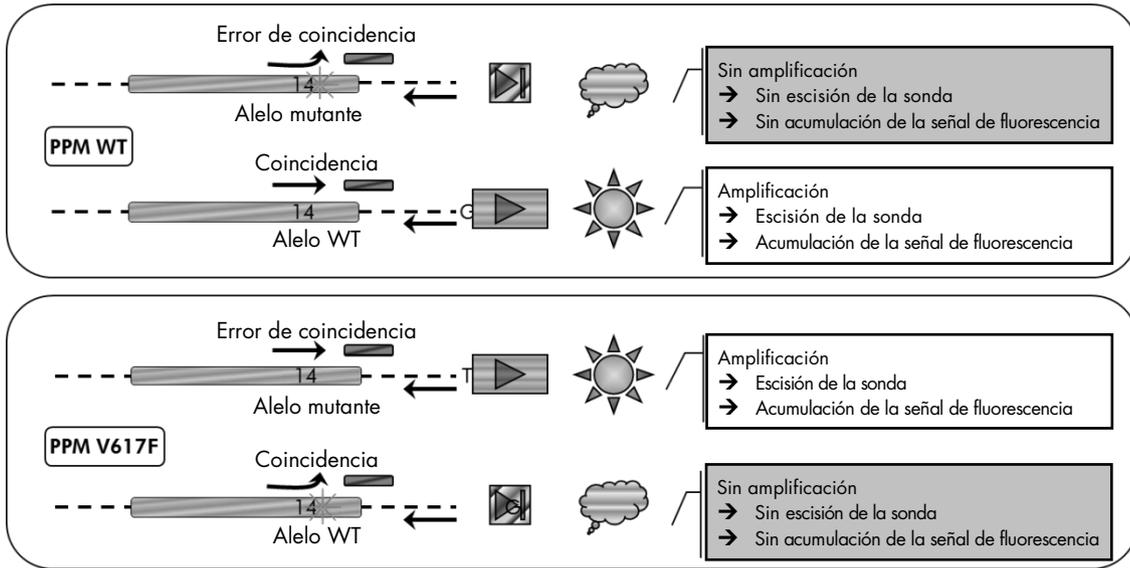


Ilustración 2. PCR específica de alelo. El empleo de mezclas de sonda y primers (PPM) del alelo nativo (WT) o del V617F posibilita la detección específica del alelo nativo o del mutado en dos reacciones distintas realizadas con la misma muestra. Los resultados pueden expresarse en porcentajes de copias de VF de un total de copias de JAK2.

Material incluido

Contenido del kit

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit (24)		
N.º de referencia		673623
Número de reacciones		24
JAK2 Mutant Control (control de mutación de JAK2) (alelo 100% V617F)	Rojo	33 µl
JAK2 WT Control (control WT de JAK2) (alelo 100% nativo)	Verde	33 µl
JAK2 MT Quant Standard 1 (estándar de cuantificación 1 MT de JAK2) (5 x 10 ¹ copias de V617F/5 µl)	Rojo	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 2 (estándar de cuantificación 2 MT de JAK2) (5 x 10 ² copias de V617F/5 µl)	Rojo	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 3 (estándar de cuantificación 3 MT de JAK2) (5 x 10 ³ copias de V617F/5 µl)	Rojo	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 4 (estándar de cuantificación 4 MT de JAK2) (5 x 10 ⁴ copias de V617F/5 µl)	Rojo	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 1 (estándar de cuantificación 1 WT de JAK2) (5 x 10 ¹ copias WT/5 µl)	Verde	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 2 (estándar de cuantificación 2 WT de JAK2) (5 x 10 ² copias WT/5 µl)	Verde	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 3 (estándar de cuantificación 3 WT de JAK2) (5 x 10 ³ copias WT/5 µl)	Verde	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 4 (estándar de cuantificación 4 WT de JAK2) (5 x 10 ⁴ copias WT/5 µl)	Verde	20 µl
JAK2 MT Reaction Mix (mezcla de reacción MT de JAK2)*	Rojo	1.010 µl
JAK2 WT Reaction Mix (mezcla de reacción WT de JAK2)†	Verde	1.010 µl
Taq DNA polymerase (ADN polimerasa Taq) (5 unidades/µl de HotStarTaq®)	Menta	85 µl
Tampón TE para la dilución de la muestra	Blanco	1,9 ml
Agua para el control sin molde (NTC)	Blanco	1,9 ml
ipsogen® JAK2 RGQ PCR Kit Handbook (manual de uso en inglés)		1

* Mezcla de PCR que contiene todos los componentes necesarios, salvo ADN polimerasa Taq y el ADN objetivo del alelo MT.

† Mezcla de PCR que contiene todos los componentes necesarios, salvo ADN polimerasa Taq y el ADN objetivo del alelo WT.

Materiales requeridos 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 hojas de datos correspondientes sobre seguridad (SDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

Fungibles y reactivos para la extracción manual de ADN

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de referencia 61104)
- Ethanol (96–100%)
Nota: no utilice alcohol desnaturalizado, ya que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona.

Fungibles y reactivos para la extracción automática de ADN

- QIAasymphony® DSP DNA Mini Kit (n.º de referencia 937236)
- Cartuchos para la preparación de muestras, 8 pocillos (n.º de referencia 997002)
- Tapas con 8 ruedas (n.º de referencia 997004)
- Puntas con filtro, 1.500 µl (n.º de referencia 997024)
- Puntas con filtro, 200 µl (n.º de referencia 990332)
- Microtubos de elución CL (n.º de referencia 19588)
- Bolsas para la eliminación de puntas (n.º de referencia 9013395)
- Microtubos de 2,0 ml tipo H (Sarstedt®, n.º de referencia 72.694, www.sarstedt.com)

Fungibles y reactivos para la PCR

- Puntas de pipeta para PCR estériles, libres de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros hidrófobos
- Tubos de PCR exentos de nucleasas de 1,5 ml o 2,0 ml
- Tubos y tapones de tiras de 0,1 ml para el equipo Rotor-Gene Q (n.º de referencia 981103 ó 981106)
- Hielo

Equipo

- Micropipeta (ajustable)* específica para PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1.000 µl)
- Guantes desechables
- Agitador vórtex
- Bloque térmico para la lisis de muestras a 56 °C
- Centrífuga de mesa* con rotor para tubos de reacción de 0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml (capaz de alcanzar 13.000-14.000 rpm)

* Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

- Espectrofotómetro

Equipo para la preparación automática de muestras

- Equipo QIASymphony SP (n.º de referencia 9001297), versión del software 4.0 o superior, accesorios suministrados y el protocolo Blood_200_V7_DSP
- Tube Insert 3B (inserto, 2,0 ml v2, transportador de muestras (24), Qsym, n.º de referencia 9242083)

Equipo para la PCR

- Equipo para PCR en tiempo real*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM y accesorios suministrados
- Software Rotor-Gene AssayManager® v2.1.x ($x \geq 0$) instalado
- Complemento Rotor-Gene AssayManager Gamma v1.0.x ($x \geq 0$) instalado
- Perfil de ensayo JAK2 CE importado (ipsogen_JAK2_blood_CE_V1_0_x [$x \geq 0$])

* Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

Advertencias y precauciones

Para uso de 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 hojas de datos correspondientes sobre seguridad (SDS). Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN®.

<p>PRECAUCIÓN</p> 	<p>PRECAUCIÓN: NO añada lejía ni soluciones ácidas directamente a los residuos de preparación de la muestra.</p>
--	--

Precauciones generales

El uso de pruebas de qPCR exige la adopción de buenas prácticas de laboratorio, como el correcto mantenimiento del equipo, que cumplan los reglamentos vigentes y las normas aplicables específicas para laboratorios de biología molecular.

Este kit está concebido para diagnóstico in vitro. Los reactivos y las instrucciones suministrados con este kit han sido validados para ofrecer un rendimiento óptimo.

- La prueba se ha diseñado para su uso con muestras de sangre total anticoaguladas con EDTA de potasio y almacenadas a una temperatura entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de 96 horas hasta la extracción del ADN.
- Todos los materiales químicos y biológicos son potencialmente peligrosos. Las muestras son material potencialmente infeccioso y deben tratarse como material biopeligroso.
- Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los procedimientos de seguridad local.
- Los reactivos del kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR ofrecen una dilución óptima. No debe realizarse una mayor dilución de los reactivos puesto que podrían perder eficacia.
- No utilice volúmenes de reacción (mezcla de reacción más muestra) inferiores a 25 µl.
- Todos los reactivos suministrados con el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo kit. No sustituya ningún reactivo de un kit por

el mismo reactivo de otro kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR, ni siquiera del mismo lote, ya que el rendimiento podría verse afectado.

- Consulte el manual del usuario del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM y el manual del usuario del software RGAM 2.1 para conocer las advertencias, las precauciones y los procedimientos adicionales.
- Un cambio en los tiempos y las temperaturas de incubación puede causar resultados erróneos o dispares.
- No utilice componentes caducados o mal almacenados.
- Las mezclas de reactivos pueden verse alteradas si se exponen a la luz.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación de las mezclas con los materiales sintéticos incluidos en los reactivos de los estándares de cuantificación JAK2 MT y JAK2 WT y con los reactivos de control de mutación JAK2 y JAK2 WT.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación por arrastre del ADN o de los productos de la PCR, que podría producir una señal positiva falsa.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación por DNasa, que podría degradar el molde de ADN.
- Utilice pipetas individuales exclusivas para preparar las mezclas de reacción y añadir moldes.
- No abra el equipo Rotor-Gene Q MDx hasta que no haya terminado la serie analítica.
- No abra los tubos del equipo Rotor-Gene Q tras la finalización de la serie analítica.
- Es importante controlar que las pruebas se realicen correctamente, haciendo especial hincapié en la introducción incorrecta de muestras, los errores de carga y los errores de pipeteo.
- Asegúrese de que las muestras se manipulan de forma sistemática para garantizar la correcta identificación en todo momento y mantener la trazabilidad.

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.
- Utilizar puntas de pipeta resistentes a los aerosoles nuevas en todos los pasos del pipeteado para evitar la contaminación cruzada entre las muestras y los reactivos.
- Preparar la premezcla maestra (master mix) para PCR con el material específico (pipetas, puntas, etc.) en una zona delimitada donde no se introduzcan matrices de ADN (ADN, plásmidos o productos de la PCR). Añadir los moldes de ADN en una zona aislada (preferiblemente una sala independiente) con material específico (pipetas, puntas, etc.).

Para obtener información de seguridad relacionada con los kits de extracción QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104) y QIASymphony DNA DSP Mini (n.º de referencia 937236), consulte los manuales de uso correspondientes.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

Condiciones de envío

El kit *ipsogen* JAK2 PGQ PCR se suministra en hielo seco. Si alguno de los componentes del kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR (aparte de la enzima) no está congelado a la llegada, si el embalaje externo se ha abierto durante el transporte o si el envío no incluye la nota de embalaje, el manual o los reactivos, póngase en contacto con los departamentos del servicio técnico de QIAGEN (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Condiciones de almacenamiento

El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR debe almacenarse inmediatamente tras su recepción en un congelador a una temperatura constante de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y protegerlo de la luz.

Para obtener información de almacenamiento relacionada con los kits de extracción QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104) y QIASymphony DNA DSP Mini (n.º de referencia 937236), consulte los manuales de uso correspondientes.

Estabilidad

Si se almacena en las condiciones especificadas, el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja.

Una vez abiertos, los reactivos deben almacenarse en el embalaje original a una temperatura comprendida entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja. No es aconsejable descongelarlo y volver luego a congelarlo. No exceda el máximo de 5 ciclos de congelación-descongelación.

Para obtener información de estabilidad relacionada con los kits de extracción QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104) y QIASymphony DNA DSP Mini (n.º de referencia 937236), consulte los manuales de uso correspondientes.

- Mezcle cuidadosamente invirtiendo el tubo 10 veces y centrifugue todos los tubos excepto la enzima antes de abrirlos.
- La fecha de caducidad de cada reactivo figura en las etiquetas de cada componente. En las condiciones de almacenamiento adecuadas, el producto mantendrá su rendimiento durante el período de estabilidad siempre que se utilicen los mismos lotes de componentes.

- Los procedimientos de control de calidad de QIAGEN emplean pruebas funcionales de liberación de kit para cada lote de kit por separado. Por este motivo, no se deben mezclar reactivos de distintos kits, ni siquiera del mismo lote..

Manipulación y almacenamiento de muestras

Muestras de sangre total

El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR está diseñado para su uso con muestras de ADN genómico extraídas de muestras de sangre total anticoagulada con EDTA de potasio almacenadas en las siguientes condiciones:

- A una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de 96 horas,
- A una temperatura comprendida entre 15 °C y 25 °C durante un máximo de 96 horas, o bien
- Congeladas a una temperatura comprendida entre -15 °C y -30 °C durante un máximo de 1 mes

Nota: las muestras de sangre total deben enviarse bajo las mismas condiciones en las que se encuentran las muestras almacenadas para evitar cambios de temperatura durante el almacenamiento y el envío.

Muestras de ADN genómico

Una vez extraído el ADN genómico, las muestras se pueden almacenar y transportar a una temperatura comprendida entre -30 °C y -15 °C durante un máximo de 15 meses, tanto directamente después de la extracción como después de su dilución en el tampón TE.

Procedimiento

Extracción y preparación de ADN genómico de muestras de sangre total

El ADN genómico debe extraerse mediante el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104) o el equipo QIASymphony SP en combinación con el kit QIASymphony DSP DNA Mini (n.º de referencia 937236).

Asegúrese de que los reactivos que se van a utilizar no han caducado y se han transportado y almacenado en las condiciones adecuadas.

Nota: el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR solamente se ha validado para su uso con el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104) o el kit QIASymphony DSP DNA Mini (n.º de referencia 937236). No utilice ningún otro producto de extracción de ADN.

Extracción manual de ADN genómico mediante el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini

La extracción manual de ADN genómico debe realizarse con el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104), según el *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook* (manual del kit QIAamp DSP DNA Blood Mini) correspondiente.

Antes de comenzar

- **Deje que las muestras de sangre alcancen la temperatura ambiente (15 °C-25 °C) y asegúrese de que están bien homogeneizadas**

- **Preparación del tampón de lisis**

Si se ha formado algún precipitado en el tampón de lisis (AL), disuélvalo incubándolo a una temperatura de 56 °C.

- **Preparación de la proteasa de QIAGEN**

Añada 1,2 ml de disolvente de proteasa (PS) al vial de proteasa de QIAGEN (QP) liofilizada y mezcle cuidadosamente. Para evitar la formación de espuma, mezcle invirtiendo el vial varias veces. Asegúrese de que la proteasa de QIAGEN (QP) se ha disuelto por completo.

Nota: no añada QP directamente al tampón de lisis (AL).

- **Preparación del tampón de lavado 1**

Con un cilindro de medición, añada 25 ml de etanol (96-100%) a la botella que contiene 19 ml de concentrado de tampón de lavado 1 (AW1). Almacene el tampón de lavado 1 (AW1) reconstituido a temperatura ambiente (15 °C-25 °C).

Nota: mezcle siempre el tampón de lavado 1 (AW1) reconstituido invirtiendo la botella varias veces antes de iniciar el procedimiento.

- **Preparación del tampón de lavado 2**

Con un cilindro de medición, añada 30 ml de etanol (96-100%) a la botella que contiene 13 ml de concentrado de tampón de lavado 2 (AW2). Almacene el tampón de lavado 2 (AW2) reconstituido a temperatura ambiente (15 °C-25 °C).

Nota: mezcle siempre el tampón de lavado 2 (AW2) reconstituido invirtiendo la botella varias veces antes de iniciar el procedimiento.

- **Preparación del tampón de elución**

Se suministra un tampón de elución (AE) con el kit. Para evitar la contaminación del tampón de elución (AE), se recomienda utilizar puntas de pipeta con barreras para aerosoles cuando se pipetea el tampón de elución (AE) de la botella y sustituir el tapón de la misma inmediatamente después.

Deje que el tampón de elución (AE) alcance la temperatura ambiente (15 °C-25 °C).

- Ponga un bloque térmico a 56 °C para utilizarlo en el paso 4.

Procedimiento

1. Pipetee 20 µl de proteasa de QIAGEN (QP) en un tubo de lisis (LT).

Nota: compruebe la fecha de caducidad de la proteasa reconstituida antes de utilizarla.

2. Añada 200 µl de muestra de sangre al tubo de lisis (LT).
3. Añada 200 µl de tampón de lisis (AL) al tubo de lisis (LT), cierre la tapa y mezcle con un agitador vórtex en el modo de pulso durante 15 segundos.

Nota: para garantizar la eficacia de la lisis, es fundamental que la muestra y el tampón de lisis (AL) se mezclen bien a fin de obtener una solución homogénea.

Nota: dada la alta viscosidad del tampón de lisis (AL), asegúrese de añadir el volumen correcto de tampón de lisis (AL) pipeteando con cuidado o utilizando una pipeta adecuada.



No añada proteasa de QIAGEN (QP) directamente al tampón de lisis (AL).

4. Incube la mezcla a 56 °C (± 1 °C) durante 10 minutos (± 1 minuto).
5. Centrifugue el tubo de lisis (LT) durante aproximadamente 5 segundos a velocidad máxima para eliminar las gotas del interior de la tapa.
6. Añada 200 µl de etanol (96-100%) al tubo de lisis (LT), cierre la tapa y mezcle bien con un agitador vórtex en el modo de pulso durante ≥ 15 segundos.
7. Centrifugue el tubo de lisis (LT) durante ≥ 5 segundos a velocidad máxima para eliminar las gotas del interior de la tapa.
8. Aplique cuidadosamente todo el lisado del paso 7 a la columna de centrifugado QIAamp Mini sin mojar el borde. Evite tocar la membrana de la columna de centrifugado QIAamp Mini con la punta de pipeta.

Nota: si se procesan varias muestras, abra los tubos de lisis (LT) de uno en uno.

9. Cierre la tapa de la columna de centrifugado QIAamp Mini y centrifugue a aproximadamente 6.000 x g durante 1 minuto. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de lavado (WT) limpio y deseche el tubo que contiene el filtrado.

Nota: si el lisado no ha traspasado completamente la membrana tras el centrifugado a 6.000 x g (8.000 rpm), vuelva a centrifugar a velocidad máxima (hasta 20.800 x g) durante 1 minuto.

Nota: si el lisado sigue sin traspasar la membrana durante el centrifugado, deseche la muestra y repita el aislamiento y la purificación con material de muestra nuevo.

10. Abra cuidadosamente la columna de centrifugado QIAamp Mini y añada 500 µl de tampón de lavado 1 (AW1) sin mojar el borde. Evite tocar la membrana de la columna de centrifugado QIAamp Mini con la punta de pipeta.

11. Cierre la tapa de la columna de centrifugado QIAamp Mini y centrifugue a aproximadamente 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de lavado (WT) limpio y deseche el tubo que contiene el filtrado.
12. Abra cuidadosamente la columna de centrifugado QIAamp Mini y añada 500 µl de tampón de lavado 2 (AW2) sin mojar el borde. Evite tocar la membrana de la columna de centrifugado QIAamp Mini con la punta de pipeta.
13. Cierre la tapa de la columna de centrifugado QIAamp Mini y centrifugue a velocidad máxima (aproximadamente 20.000 x g o 14.000 rpm) durante 1 minuto. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de lavado (WT) limpio y deseche el tubo que contiene el filtrado.
14. Centrifugue a velocidad máxima (aproximadamente 20.000 x g o 14.000 rpm) durante 3 minutos para secar completamente la membrana.
15. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de elución (ET) limpio y deseche el tubo de lavado (WT) que contiene el filtrado. Abra cuidadosamente la tapa de la columna de centrifugado QIAamp Mini y aplique de 50 a 200 µl de tampón de elución (AE) en el centro de la membrana. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente (15 °C-25 °C) durante 1 minuto. Centrifugue a aproximadamente 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto para eluir el ADN.
16. Deseche los tubos de muestra usados, las placas y los residuos conforme a los requisitos de seguridad local.

Extracción automática de ADN genómico mediante el kit QIASymphony DSP DNA Mini

La extracción automática de ADN genómico debe realizarse con el equipo QIASymphony utilizando el módulo de preparación de muestras en combinación con el kit QIASymphony DSP DNA Mini (n.º de referencia 937236) y siguiendo las instrucciones del *QIASymphony DSP DNA Kit Handbook* (manual del kit QIASymphony DSP DNA). Las funciones del protocolo de JAK2 aparecen destacadas con el símbolo  en el procedimiento que se describe a continuación.

Con el módulo QIASymphony SP, el kit QIASymphony DSP DNA Mini permite la purificación automática de ADN de sangre total humana (utilizando el protocolo Blood_200_V7_DSP del módulo QIASymphony).

- No se requiere pretratamiento.
- Los tubos se transfieren directamente al módulo QIASymphony SP.
- La purificación del ADN se realiza con partículas magnéticas

Cuestiones importantes antes de comenzar



- El volumen de sangre total que se debe extraer es de 300 µl.
- Familiarícese con el funcionamiento del módulo QIASymphony SP. Consulte los manuales de usuario suministrados con el equipo para conocer las instrucciones de funcionamiento.
- Realizar el mantenimiento opcional no es obligatorio para el funcionamiento del equipo, pero se recomienda aplicarlo para reducir el riesgo de contaminación.
- Antes de utilizar un cartucho de reactivos por primera vez, compruebe que los tampones QSL1 y QSB1 no contienen ningún precipitado. En caso necesario, extraiga los contenedores que contienen tampones QSL1 y QSB1 del cartucho de reactivos e incúbelos durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C agitándolos ocasionalmente para disolver el precipitado. Asegúrese de volver a colocar los contenedores en las posiciones correctas. Si un cartucho de reactivos ya está perforado, asegúrese de que los contenedores están sellados con tiras de sellado para reutilización e incube el cartucho de reactivos durante 30 minutos a 37 °C agitándolo ocasionalmente en un baño de agua.
- Evite agitar con fuerza el cartucho de reactivos (RC) para no generar espuma, ya que pueden producirse problemas de detección del nivel de líquidos.

Antes de comenzar

- Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de que las partículas magnéticas están totalmente resuspendidas. Agite con fuerza el contenedor que contiene las partículas magnéticas durante un mínimo de 3 minutos antes del primer uso.
- Asegúrese de que la tapa de perforación está colocada en el cartucho de reactivos y de que se ha retirado la tapa del contenedor de partículas magnéticas o, si utiliza un cartucho de reactivos parcialmente usado, asegúrese de que se han retirado las tiras de sellado para reutilización.
- Asegúrese de abrir los tubos de enzimas.
- Si las muestras tienen códigos de barras, colóquelas en el transportador de tubos de modo que los códigos estén orientados hacia el lector de códigos de barras situado en la parte izquierda del módulo QIASymphony SP.

Procedimiento

1. Cierre todos los cajones y la cabina.
2. Encienda el módulo QIASymphony SP y espere hasta que aparezca la pantalla "Sample Preparation" (Preparación de la muestra) y finalice el procedimiento de inicialización.

Nota: el botón de encendido está ubicado en la parte inferior, en la esquina izquierda del módulo QIA Symphony SP.

3. Inicie sesión en el equipo.
4. Asegúrese de que el cajón "Waste" (Residuos) está correctamente preparado y realice una exploración del inventario del cajón "Waste" (Residuos), incluidos el conducto de puntas y el contenedor de residuos líquidos. En caso necesario, sustituya la bolsa para la eliminación de puntas.
5. Cargue la bandeja de elución correspondiente en el cajón "Eluate" (Eluido).
No cargue una placa de 96 pocillos en la ranura "Elution slot 4" (Ranura de elución 4).
Utilice la ranura "Elution slot 1" (Ranura de elución 1) con el adaptador de enfriamiento correspondiente.
Si utiliza una placa de 96 pocillos, asegúrese de que esté correctamente orientada, ya que, en caso contrario, se podrían mezclar las muestras en fases posteriores del análisis.
6. Cargue los cartuchos de reactivos y los fungibles necesarios en el cajón "Reagents and Consumables" (Reactivos y fungibles).

Nota: asegúrese de que las puntas de pipeteo están correctamente ajustadas.

7. Realice una exploración del inventario del cajón "Reagents and Consumables" (Reactivos y fungibles).



8. Transfiera **300 µl** de la muestra de sangre total que se debe extraer a un microtubo (2,0 ml tipo H) y colóquelo en el adaptador 3b de 2 ml, en el transportador de muestras de tubo. Cargue los tubos de muestras en el cajón "Sample" (Muestra).
9. Mediante la pantalla táctil, introduzca la información requerida para cada lote de muestras que se va a procesar:
 - Información de la muestra: cambie el formato de tubo predeterminado. Para ello, seleccione el botón "Select All" (Seleccionar todos) y, a continuación, "Sarstedt reference 72.694" (Sarstedt referencia 72.694) de la tabla "Tube Insert".
 - Protocolo que se debe ejecutar: seleccione el botón "Select All" (Seleccionar todos) y, a continuación, la categoría "DNA Blood" (Sangre ADN) → Blood_200_V7_DSP para la muestra de sangre total.
 -  Volumen de elución y posición de salida: 100 µl para el protocolo de sangre total.
Nota: una vez introducida la información sobre el lote, el estado cambia de "LOADED" (Cargado) a "QUEUED" (En cola). Cuando un lote está en cola, aparece el botón "Run" (Ejecutar).
10. Inicie la serie.

- Para iniciar la serie, pulse el botón "Run" (Ejecutar).
- Lea y confirme el mensaje que se muestra.

Nota: se recomienda esperar junto al equipo hasta que éste lleve a cabo la detección del nivel de líquidos de los tubos de control internos y el estado del transportador del módulo QIASymphony SP cambie a "RUNNING" (En ejecución).

Nota: no interrumpa ni detenga la serie durante el procesamiento (excepto si se produce una emergencia), ya que esto provocaría que las muestras se marcaran como "unclear" (dudosas).

Nota: se pueden cargar muestras continuamente y añadir las a esta serie (hasta que se carguen los reactivos). Pulse el botón "Run" (Ejecutar) para iniciar el procedimiento de purificación.

11. Al finalizar la serie de protocolo, el estado del lote cambia de "RUNNING" (En ejecución) a "COMPLETED" (Completado). Retire la bandeja de elución que contiene los ácidos nucleicos purificados del cajón "Eluate" (Eluido).

Se recomienda retirar la placa del eluido del cajón "Eluate" (Eluido) inmediatamente después de la finalización de la serie. Según la temperatura y la humedad existentes, las placas de eluido que se dejan en el módulo QIASymphony SP una vez completada la serie pueden experimentar condensación o evaporación.

Nota: en general, las partículas magnéticas no se transfieren a los eluidos. Si se observan partículas negras en algún eluido, las partículas magnéticas se pueden eliminar tal como se indica a continuación:

Aplique el tubo que contiene el ADN a un separador magnético adecuado (p. ej., QIAGEN 12-Tube Magnet [imán de 12 tubos de QIAGEN], n.º de referencia 36912) hasta que se separen las partículas magnéticas. Si el ADN está en microplacas, aplique la microplaca a un separador magnético adecuado (p. ej., QIAGEN 96-Well Magnet Type A [imán de 96 pocillos de tipo A de QIAGEN], n.º de referencia 36915) hasta que se separen las partículas magnéticas. Si no hay ningún separador magnético disponible, centrifugue el tubo que contiene el ADN durante 1 minuto a velocidad máxima en una microcentrífuga para sedimentar las partículas magnéticas restantes.

12. Exporte el archivos de resultados del módulo QIASymphony SP: este informe se genera para cada placa de elución.
 - Inserte la unidad USB en uno de los puertos USB de la parte frontal del módulo QIASymphony SP;
 - Haga clic en el botón "Tools" (Herramientas);
 - Seleccione "File Transfer" (Transferencia de archivos);
 - En la pestaña "In-/Output Files" (Archivos de entrada/salida), seleccione "Results Files" (Archivos de resultados) y haga clic en "Transfer" (Transferir).

Mantenga el nombre de la exportación del archivo en el siguiente formato: aaaa-mm-dd hh:mm:ss_ID de la bandeja de elución.

13. Compruebe la columna "Validity of result" (Validez del resultado) para cada muestra del archivo de resultados del módulo QIASymphony SP.
 - Estado válido y anómalo: proceda con la cualificación y la cuantificación del ADN.
 - Estado no válido: la muestra se ha rechazado. Vuelva a realizar el paso de extracción.
14. Si un cartucho de reactivos solo está usado parcialmente, séllelo con las tiras de sellado para reutilización suministradas y cierre los tubos que contienen la proteinasa K con tapones de rosca inmediatamente después de finalizar la serie de protocolo para evitar la evaporación.
15. Deseche los tubos de muestra usados, las placas y los residuos conforme a los requisitos de seguridad local.
16. Limpie el módulo QIASymphony SP.

Siga las instrucciones de mantenimiento de los manuales de usuario suministrados con el equipo. Asegúrese de limpiar la protección de las puntas periódicamente para minimizar el riesgo de contaminación cruzada.
17. Cierre los cajones del equipo y apague el módulo QIASymphony SP.

Cualificación y cuantificación del ADN

Se debe utilizar un blanco de tampón ATE o AE para calibrar el espectrofotómetro. Es necesario utilizar estos tampones porque los tampones de elución utilizados en los kits de extracción de ADN genómico contienen la azida sódica de conservación, que absorbe a 260 nm.

- El cociente de la A_{260}/A_{280} debe ser $\geq 1,7$, ya que los cocientes inferiores suelen indicar contaminación proteica o la presencia de sustancias químicas orgánicas que afectan al paso de la PCR.
- La cantidad de ADN se determina midiendo la densidad óptica a 260 nm.
- Cantidad total de ADN purificado = concentración x volumen de la muestra en μl .
- Si el cociente de A_{260}/A_{280} es inferior a 1,7 y la concentración de ADN genómico es menor que 10 ng/ μl , la muestra no debe seguir procesándose.

Normalización de muestras de ADN genómico

El ADN debe diluirse a 10 ng/ μl en el tampón TE suministrado con el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR.

La reacción de PCR del equipo Rotor-Gene Q está optimizada para 50 ng de ADN genómico purificado diluido en un volumen final de 5 μl .

Protocolo: qPCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Cuestiones importantes antes de comenzar

- El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR debe ejecutarse en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM mediante el software Rotor-Gene AssayManager v2.1. Tómese su tiempo para familiarizarse con el equipo Rotor-Gene Q MDx antes de iniciar el protocolo. Consulte los manuales de usuario del equipo, del software Rotor-Gene AssayManager v2.1 y del complemento Gamma para obtener más información.
- El software Rotor-Gene AssayManager v2.1 permite interpretar automáticamente los resultados de la PCR. Los parámetros de ciclado están bloqueados para la serie.

Antes de comenzar

El software Rotor-Gene AssayManager v2.1 debe estar instalado en el ordenador conectado al equipo Rotor-Gene Q y puede descargarse del sitio web de QIAGEN: www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx. Para obtener más información sobre la instalación del software Rotor-Gene AssayManager v2.1 consulte el *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual de usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application).

- El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR necesita específicamente el complemento Gamma. Este complemento se puede descargar desde la siguiente página del sitio web de QIAGEN: www.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. El complemento debe instalarse en un ordenador que ya tenga el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 instalado.
- El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR también necesita un perfil de ensayo. Dicho perfil (archivo .iap) contiene todos los parámetros necesarios para realizar el ciclado y el análisis del ensayo de qPCR. Se puede descargar desde la página del sitio web de QIAGEN dedicada al kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR: www.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. El perfil de ensayo debe importarse al software Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Nota: el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR solo se puede ejecutar si se configuran unos ajustes determinados en el software Rotor-Gene AssayManager.

Para la seguridad del proceso en todo el sistema, es necesario configurar los siguientes ajustes para el modo cerrado:

- "Material number required" (Número de material requerido)

- “Valid expiry date required” (Fecha de caducidad válida requerida)
- “Lot number required” (Número de lote requerido)

Instalación del complemento Gamma e importación del perfil de ensayo

La instalación e importación del complemento Gamma y el perfil de ensayo se describen en el *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual de usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application) y el *Gamma Plug-in User Manual* (manual de usuario del complemento Gamma).

- Descargue tanto el complemento Gamma como la versión más reciente del perfil de ensayo JAK2 CE del sitio web de QIAGEN.
- Inicie el proceso de instalación haciendo doble clic en el archivo RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi y siga las instrucciones de instalación. Para obtener una descripción detallada de este proceso, consulte el apartado “Installing Plug-ins” (Instalación de complementos) del *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application).

Nota: para la seguridad del proceso en todo el sistema, seleccione la pestaña “Settings” (Configuración) y marque las casillas “Material number required” (Número de material requerido), “Valid expiry date required” (Fecha de caducidad válida requerida) y “Lot number required” (Número de lote requerido) para el modo cerrado (apartado de la lista de trabajo). Si dichas casillas no están habilitadas (marcadas), haga clic en ellas para habilitarlas.

- Tras instalar correctamente el complemento, un usuario con derechos de administrador del software Rotor-Gene AssayManager deberá importar el perfil de ensayo ipsogen_JAK2_blood_CE tal como se indica a continuación:
 1. Acceda al software Rotor-Gene AssayManager como usuario con derechos de administrador.
 2. Seleccione el entorno de configuración.
 3. Seleccione la pestaña “Assay Profiles” (Perfiles de ensayo).
 4. Haga clic en el botón “Import” (Importar).
 5. Seleccione el perfil de ensayo ipsogen_JAK2_blood_CE que se va a importar en el cuadro de diálogo y haga clic en “Open” (Abrir).
 6. Una vez que el ensayo se ha importado correctamente, se puede utilizar en el entorno “Setup” (Configuración).

Nota: no se puede importar dos veces la misma versión de un perfil de ensayo.

Procesamiento de muestras en los equipos Rotor-Gene Q MDx con rotor de 72 tubos

Se recomienda analizar ocho muestras de ADN genómico en el mismo experimento para optimizar el uso de los controles, los estándares y las mezclas de reacción.

En la tabla 2 se proporciona el número de reacciones que pueden utilizarse con el rotor de 72 tubos.

El esquema que se muestra en la ilustración 3 proporciona un ejemplo de la configuración del bloque de carga o el rotor para un experimento con el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR.

Los números indican las posiciones en el bloque de carga y la posición final del rotor.

Tabla 2. Número de reacciones para equipos Rotor-Gene Q MDx con un rotor de 72 tubos

Muestras	Número de reacciones
Con la mezcla de reacción MT de JAK2	
8 muestras de ADN genómico	8
Estándares de cuantificación MT de JAK2	4
Control MT de JAK2 (mutante)	1
Control WT de JAK2 (nativo)	1
Agua para el control sin molde (NTC)	1
Con la mezcla de reacción WT de JAK2	
8 muestras de ADN genómico	8
Estándares de cuantificación WT de JAK2 (nativos)	4
Control MT de JAK2 (mutante)	1
Control WT de JAK2 (nativo)	1
Agua para el control sin molde (NTC)	1

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

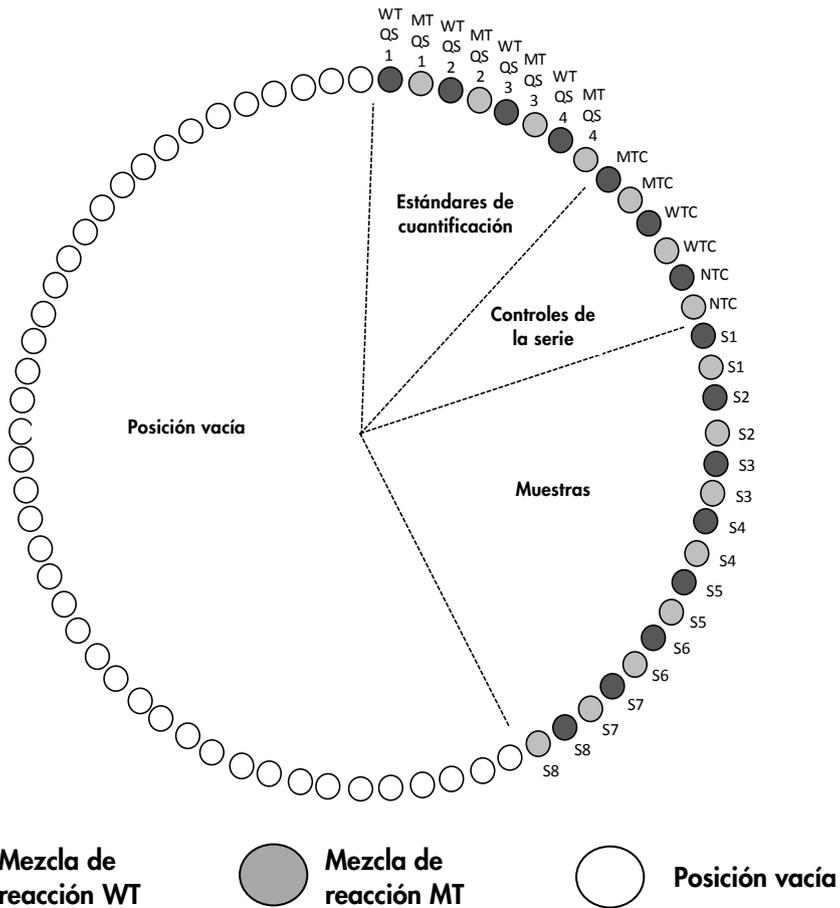


Ilustración 3. Configuración de la placa y el rotor para un experimento con el kit *ipsogen JAK2 RGQ PCR*. WTC: control WT de JAK2; MTC: control MT de JAK2; WT-QS: estándares WT de JAK2; MT-QS: estándares de cuantificación de MT de JAK2; S: muestra de ADN genómico; NTC: control sin molde (agua).



los tubos deben insertarse en el rotor tal como se indica en la Ilustración 3, ya que el análisis automático configurado en el perfil de ensayo se basa en esta organización. Si se utiliza otra distribución, se alterarían los resultados.

Nota: coloque tubos vacíos en el resto de posiciones.

qPCR en equipos Rotor-Gene Q MDx con rotor de 72 tubos

1. Cree una lista de trabajo para procesar las muestras tal como se indica a continuación.
 - Encienda el equipo Rotor-Gene Q MDx.
 - Abra el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 e inicie sesión como usuario con función de operador en el modo cerrado.
 - Haga clic en el botón "New work list" (Nueva lista de trabajo) del gestor de listas de trabajo (entorno "Setup" [Configuración]).
 - Seleccione el perfil de ensayo JAK2 CE de la lista de perfiles de ensayo disponibles en el paso "Assay" (Ensayo).
 - Haga clic en el botón "Move" (Mover) para transferir el perfil de ensayo seleccionado a la lista "Selected assay profiles" (Perfiles de ensayo seleccionados). Ahora, el perfil de ensayo debería mostrarse en la lista "Selected assay profiles" (Perfiles de ensayo seleccionados).
 - Introduzca el número de muestras en el campo correspondiente.
 - Introduzca la siguiente información del kit JAK2, que aparece impresa en la tapa de la caja
 - Número de material: 1079182
 - Fecha de caducidad válida
 - Número de loteDe forma alternativa, se puede introducir o escanear el código de barras del kit.
 - Seleccione el paso "Samples" (Muestras). Se muestra una lista con información detallada de las muestras. Esta lista representa la distribución prevista del rotor.
 - Introduzca los números de identificación de muestra en la lista, así como cualquier información de muestra opcional a modo de comentario en cada una de las muestras.
 - Seleccione el paso "Properties" (Propiedades) e introduzca un nombre de lista de trabajo.
 - Habilite la casilla de verificación "is applicable" (se aplica).
 - Guarde la lista de trabajo.
 - La lista de trabajo se puede imprimir, lo que puede ayudar con la preparación y la configuración de la qPCR. Para imprimir la lista de trabajo, pulse el botón "Print work list" (Imprimir lista de trabajo). La información detallada de las muestras se incluye como parte de la lista de trabajo.

Nota: la lista de trabajo se puede crear una vez configurado el experimento en el equipo o antes de añadir las muestras al mismo, ya que el archivo de la lista de trabajo se puede guardar.

2. Configure el experimento de qPCR.

- Descongele todos componentes necesarios salvo la enzima Taq ADN polimerasa, que se debe mantener en el congelador cuando no se utilice. Coloque los tubos que contienen los componentes que se deben descongelar en hielo.

Nota: no tarde más de 30 minutos en llevar a cabo la descongelación para evitar la degradación de los materiales.

- Limpie la zona de trabajo dedicada a la preparación de la mezcla de PCR para asegurarse de que no se contaminan los moldes ni las nucleasas.
- Mezcle cuidadosamente los tubos que contienen los estándares, los controles y las mezclas de reacción invirtiéndolos 10 veces y centrifúguelos brevemente antes de utilizarlos.

3. Prepare las siguientes mezclas de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.

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

En la Tabla 3 y la Tabla 4 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos MT y una mezcla de reactivos WT, calculadas para lograr unos volúmenes de reacción finales de 25 µl. Se incluyen volúmenes adicionales para compensar el error de pipeteo y para albergar 8 muestras, además de los controles.

Tabla 3. Preparación de mezclas de qPCR para la detección de la secuencia de mutación de JAK2

Componente	1 reacción (µl)	15 +1* reacciones (µl)	Concentración final
Mezcla de reacción MT de JAK2	19,8	316,8	1x
Taq ADN polimerasa	0,2	3,2	1x
Muestra (añadir en el paso 4)	5	5 en cada una	-
Volumen total	25	25 en cada una	-

* Se incluye un volumen de reacción adicional como volumen muerto.

Tabla 4. Preparación de mezclas de qPCR para la detección de la secuencia nativa de JAK2

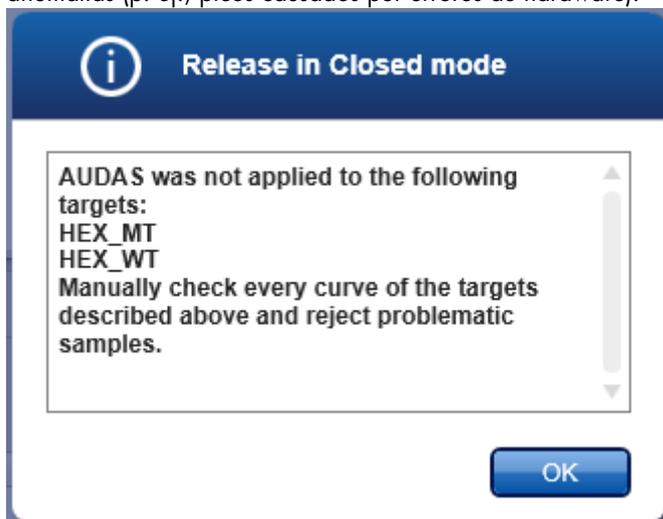
Componente	1 reacción (µl)	15 +1* reacciones (µl)	Concentración final
Mezcla de reacción WT de JAK2	19,8	316,8	1x
Taq ADN polimerasa	0,2	3,2	1x
Muestra (añadir en el paso 4)	5	5 en cada una	-
Volumen total	25	25 en cada una	-

* Se incluye un volumen de reacción adicional como volumen muerto.

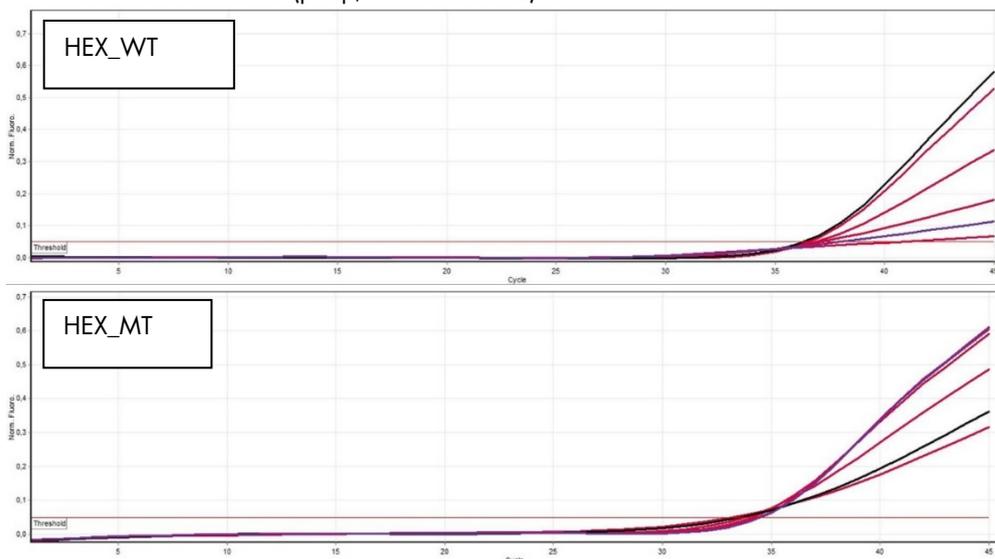
- Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente antes de dispensar 20 µl de premezcla de qPCR por tubo de tira.
 - Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente el ADN (muestras de ADN genómico y QS y controles). A continuación, añada 5 µl del material que debe cuantificarse en el tubo correspondiente para obtener un volumen total de 25 µl. Mezcle suavemente pipeteando arriba y abajo.
 - **Nota:** asegúrese de cambiar las puntas para cada tubo con el fin de evitar la contaminación no específica de moldes o mezclas de reacción y, de este modo, los resultados de falsos positivos.
 - Vuelva a colocar todos los componentes del kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR en el congelador para evitar la degradación de los materiales.
4. Prepare el equipo Rotor-Gene Q MDx e inicie la serie tal como se indica a continuación.
- Coloque un rotor de 72 pocillos en el soporte del rotor Rotor-Gene Q MDx.
 - Rellene el rotor con tubos de tiras según las posiciones asignadas, empezando por la posición 1, tal como se indica en la Ilustración 3, con tubos de tiras tapados vacíos colocados en todas las posiciones que no se utilizan.
 - **Nota:** asegúrese de insertar el primer tubo en la posición 1 y de orientar correctamente los tubos de tiras y colocarlos en las posiciones adecuadas, tal como se muestra en la Ilustración 3.
 - Coloque el anillo de fijación.
 - Cargue el equipo Rotor-Gene Q MDx con el rotor y el anillo de fijación y cierre la tapa.
 - En el software Rotor-Gene AssayManager v2.1, seleccione la lista de trabajo correspondiente del gestor de listas de trabajo y haga clic en el botón "Apply" (Aplicar), o bien, si la lista de trabajo sigue abierta, haga clic en el botón "Apply" (Aplicar).
 - **Nota:** si no se ha creado la lista de trabajo específica del experimento, inicie sesión en el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 y siga el paso 2 antes de proceder como se indica a continuación.
 - Introduzca el nombre del experimento.
 - Seleccione el ciclador que se va a utilizar en "Cycler selection" (Selección del ciclador).
 - Compruebe si el anillo de fijación se ha colocado correctamente y confirme en la pantalla que está colocado.
 - Haga clic en el botón "Start run" (Iniciar serie).
 - Se debería iniciar la serie JAK2 RGQ PCR.
5. Para finalizar la serie, siga los pasos que se indican a continuación.
- Cuando finalice la serie, haga clic en "Finish run" (Finalizar serie).
 - Desbloquee y apruebe la serie:
 - Para los usuarios que han iniciado sesión con la función de aprobación: Haga clic en "Release and go to approval" (Desbloquear y pasar a aprobación).
 - Para los usuarios que han iniciado sesión con la función de operador: Haga clic en "Release" (Desbloquear).

6. Desbloquee los resultados.

- Si ha hecho clic en “Release and go to approval” (Desbloquear y pasar a aprobación), se muestran los resultados del experimento.
- Se muestra la siguiente alerta AUDAS (Automatic Data Scan [Escaneado automático de datos]). Compruebe los objetivos HEX de forma manual en el apartado “Plots and Information” (Gráficos e información) de las curvas de datos primarios para detectar anomalías (p. ej., picos causados por errores de hardware).



Tenga en cuenta que las curvas de los objetivos HEX de control interno no muestran formas sigmoideas (como en el siguiente ejemplo de curvas) y deben considerarse como curvas válidas. Tenga en cuenta que el software verifica de forma automática todos los criterios de validez interna (p. ej., umbrales de C_T).



- Si un usuario con la función de operador ha hecho clic en “Release” (Desbloquear), otro usuario con la función de aprobación deberá iniciar sesión y seleccionar el entorno “Approval” (Aprobación).
 - Filtre por el ensayo que se debe aprobar seleccionando las opciones de filtrado y haciendo clic en el botón “Apply” (Aplicar).
 - Aparece la alerta AUDAS (Automatic Data Scan [Escaneado automático de datos]). Compruebe los objetivos HEX de forma manual en el apartado “Plots and Information” (Gráficos e información) de las curvas de datos primarios para detectar anomalías (p. ej., picos causados por errores de hardware).
 - Tenga en cuenta que las curvas de los objetivos HEX de control interno no muestran formas sigmoideas (como en el anterior ejemplo de curvas) y deben considerarse como curvas válidas. Tenga en cuenta que el software verifica de forma automática todos los criterios de validez interna (p. ej., umbrales de C_T).
 - Revise los resultados y haga clic en el botón “Release/Report data” (Desbloquear/Crear informe de datos).
 - Haga clic en “OK” (Aceptar). El informe se generará en formato .pdf y se guardará automáticamente en la carpeta predefinida.

De forma predeterminada, la ruta de la carpeta es:

QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Nota: esta ruta y carpeta se pueden cambiar en el entorno “Configuration” (Configuración).

Nota: para la resolución de problemas, se necesita un paquete de asistencia de la serie. Los paquetes de asistencia se pueden generar desde el entorno de aprobación o archivado (manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager Core Application [Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual], apartado “Troubleshooting” [Resolución de problemas], “Creating a support package” [Creación de un paquete de soporte]). Asimismo, puede resultar útil realizar un seguimiento de auditoría desde el momento del incidente ± 1 día. El seguimiento de auditoría se puede recuperar en el entorno de servicio (manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager Core Application v2.1 [Rotor-Gene AssayManager Core Application User Manual v2.1], apartado 1.5.5.5).

7. Descargue el equipo Rotor-Gene Q MDx y deseche los tubos de tiras conforme a los requisitos de seguridad local.

Interpretación de los resultados

El análisis está totalmente automatizado.

El software Rotor-Gene AssayManager v2.1 analiza, en primer lugar*, las curvas de amplificación y puede invalidar las curvas discordantes en función de su forma y amplitud de sonido. En este caso, se asociará un indicador con la curva invalidada.

El software Rotor-Gene AssayManager v2.1 analiza y define automáticamente los resultados de las muestras de la prueba, pero estos deben ser aprobados y liberados por el usuario que haya iniciado sesión con la función de aprobador. Los resultados de las muestras por aprobar tienen tres botones de aprobación adicionales al final de la fila que les corresponde. Estos botones se utilizan para aceptar o rechazar interactivamente los resultados de las muestras. Para obtener más información, consulte el documento *Gamma Plug-in User Manual* (manual de usuario del Gamma Plug-in).

A continuación, el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 analiza los controles de la serie:

- NTC se marca para la ausencia de amplificación específica (WT de JAK2 y MT de JAK2) y la presencia de amplificación del control interno.
- QS WT y MT: la validación se basa en R^2 y en los valores de pendiente de cada uno de los estándares.
- WTC: el número de copias total de JAK2 (TCN) debe ser lo suficientemente alto como para que se pueda interpretar este control. En este caso, se calculará el porcentaje de mutación de JAK2. Este control de serie se valida si su estado es WT según la prueba.
- MTC: el número de copias total de JAK2 debe ser lo suficientemente alto como para que se pueda interpretar este control. En este caso, se calculará el porcentaje de mutación de JAK2. Este control de serie se valida si su estado es altamente positivo para la mutación de JAK2.

Nota: el informe generado al finalizar la serie muestra los resultados obtenidos de los controles de la misma, con los indicadores de invalidación delante de los datos no válidos.

Si todos los controles de la serie son adecuados, el software Rotor-Gene AssayManager analizará las muestras no conocidas.

- En la muestra, el número de copias total debe ser lo suficientemente alto como para que se puedan interpretar los resultados. A continuación, se calculará el porcentaje de mutación de JAK2 y se proporcionará el resultado. Si no se observa ninguna amplificación específica en

* Habilitado solamente para objetivos FAM

un tubo (WT o MT), se comprobará la amplificación del control interno para garantizar que no se trata de un artefacto. Se debe observar como mínimo un valor de CT en cada tubo (WT y MT) para que el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 valide una muestra y considere válido el resultado.

Nota: si tanto los controles de la serie como los resultados de las muestras son válidos, el informe mostrará el número de copias y el porcentaje de mutación delante de cada muestra.

- La Tabla 5 muestra los indicadores de muestras no válidas que se pueden asignar a un tubo individual durante el análisis del software Rotor-Gene AssayManager v2.1, junto con una explicación del significado del indicador

En Tabla 6 (página 36), se proporcionan los indicadores de advertencia de muestras y una descripción de los términos.

Tabla 5. Indicadores de muestras no válidas y descripción de los términos

Indicador	Descripción
ANALYSIS_FAILED	El ensayo se ha definido como no válido porque el análisis ha sido erróneo. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN.
ASSAY_INVALID	El ensayo no es válido porque como mínimo un control externo no es válido.
CONSECUTIVE_FAULT	Un objetivo utilizado para el cálculo de este objetivo no es válido.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	La curva de amplificación de datos iniciales muestra una forma que se desvía del comportamiento establecido para este ensayo. Existe una probabilidad elevada de resultados incorrectos o de una interpretación errónea de los resultados.
FLAT_BUMP	La curva de amplificación de datos iniciales muestra una forma similar a un badén aplanado que se desvía del comportamiento establecido para este ensayo. Existe una probabilidad elevada de resultados incorrectos o de una interpretación errónea de los resultados (p. ej., determinación incorrecta del valor de C_T).
INVALID_CALCULATION	El cálculo de este objetivo ha sido erróneo.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	El valor de C_T detectado es superior al esperado para un control interno en el mismo tubo que el control de mutación con la mezcla de reacción nativa.
MC_IC_LOW_CT (WT)	El valor de C_T detectado es inferior al esperado para un control interno en el mismo tubo que el control de mutación con la mezcla de reacción nativa.
MC_IC_NO_CT (MT)	No hay ningún valor de C_T detectable para el control interno en el mismo tubo que el control de mutación con la mezcla de reacción de mutación.
MC_IC_NO_CT (WT)	No hay ningún valor de C_T detectable para el control interno en el mismo tubo que el control de mutación con la mezcla de reacción nativa.
MC_LOW_CN	El número de copias del control de mutación es demasiado bajo.
MC_LOW_PERCENTAGE	El porcentaje de mutación del control de mutación es demasiado bajo.
MC_NO_CN	No hay ningún número de copias para el control de mutación.
MC_NO_CT (MT)	El valor de C_T no es detectable para el control de mutación con la mezcla de reacción de mutación.
MC_NO_VALUE	El porcentaje de mutación del control de mutación no presenta ningún valor.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	La curva de amplificación excede el umbral en más de una ocasión. No se puede determinar un valor de C_T inequívoco.
NO_BASELINE	No se ha encontrado ninguna referencia inicial. No se puede realizar el análisis posterior.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	El valor de C_T detectado es superior al esperado para un control interno en el mismo tubo que el control sin molde con la mezcla de reacción de mutación.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	El valor de C_T detectado es superior al esperado para un control interno en el mismo tubo que el control sin molde con la mezcla de reacción nativa.
NTC_IC_NO_CT (MT)	No hay ningún valor de C_T detectable para el control interno en el mismo tubo que el control sin molde con la mezcla de reacción de mutación.
NTC_IC_NO_CT (WT)	No hay ningún valor de C_T detectable para el control interno en el mismo tubo que el control sin molde con la mezcla de reacción nativa.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	El valor de C_T detectado es inferior al esperado para un control interno en el mismo tubo que el control sin molde con la mezcla de reacción de mutación.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	El valor de C_T detectado es inferior al esperado para un control interno en el mismo tubo que el control sin molde con la mezcla de reacción nativa.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	Se han detectado valores de C_T en el control sin molde.
OTHER_TARGET_INVALID	Otro analito para la misma muestra no es válido.

Indicador	Descripción
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	La concentración calculada para esta muestra excede el límite técnico.
QS_HIGH_SLOPE (MT)	Se ha excedido el límite superior de la pendiente de mutación.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	Se ha excedido el límite superior de la pendiente nativa.
QS_IC_NO_CT (WT)	No hay ningún valor de C_T detectable para el control interno en el mismo tubo que uno o varios de los estándares de cuantificación nativos.
QS_LOW_SLOPE (MT)	No se ha alcanzado el límite inferior de la pendiente de mutación.
QS_LOW_SLOPE (WT)	No se ha alcanzado el límite inferior de la pendiente nativa.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	No se ha alcanzado el límite inferior de R^2 de mutación.
QS_LOW_RSQUARED (WT)	No se ha alcanzado el límite inferior de R^2 nativo.
QS_NO_CT (MT)	No hay ningún valor de C_T detectable para uno o varios de los estándares de cuantificación de mutaciones.
QS_NO_CT (WT)	No hay ningún valor de C_T detectable para uno o varios de los estándares de cuantificación nativos.
RUN_FAILED	El ensayo se ha definido como no válido debido a un problema con el termociclador o con la conexión del termociclador.
RUN_STOPPED	El ensayo se ha definido como no válido porque la serie se ha detenido manualmente.
SAMPLE_LOW_CN	El número de copias de una muestra del análisis es demasiado bajo.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	El valor de C_T detectado es superior al esperado para un control interno en el mismo tubo que una muestra del análisis con la mezcla de reacción de mutación.
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	El valor de C_T detectado es inferior al esperado para un control interno en el mismo tubo que una muestra del análisis con la mezcla de reacción de mutación.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	No hay ningún valor de C_T detectable para el control interno en el mismo tubo que una muestra del análisis con la mezcla de reacción de mutación.
SAMPLE_NO_CN	No existe un número de copia para una muestra del análisis.
SAMPLE_NO_VALUE	El porcentaje de mutación de una muestra del análisis no presenta ningún valor.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	El valor de C_T detectado es superior al esperado para un control interno en el mismo tubo que una muestra del análisis con la mezcla de reacción nativa.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	El valor de C_T detectado es inferior al esperado para un control interno en el mismo tubo que una muestra del análisis con la mezcla de reacción nativa.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	No hay ningún valor de C_T detectable para el control interno en el mismo tubo que una muestra del análisis con la mezcla de reacción nativa.
SATURATION	La fluorescencia de los datos iniciales presenta una saturación elevada antes del punto de inflexión de la curva de amplificación.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Se ha detectado un pico en la curva de amplificación próximo al valor de C_T .
STEEP_BASELINE	Se ha detectado una referencia con crecimiento abrupto para la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación.
STRONG_BASELINE_DIP	Se ha detectado un descenso abrupto en la referencia para la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación.
STRONG_NOISE	Se ha detectado una señal de ruido fuerte fuera de la fase de crecimiento de la curva de amplificación.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Se ha detectado una señal de ruido fuerte en la fase de crecimiento (exponencial) de la curva de amplificación.

Indicador	Descripción
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Se ha detectado una referencia ondulante para la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	El porcentaje de mutación del control nativo es demasiado elevado.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	El valor de C_T detectado es superior al esperado para un control interno en el mismo tubo que el control nativo con la mezcla de reacción de mutación.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	El valor de C_T detectado es inferior al esperado para un control interno en el mismo tubo que el control nativo con la mezcla de reacción de mutación.
WTC_IC_NO_CT (MT)	No hay ningún valor de C_T detectable para el control interno en el mismo tubo que el control nativo con la mezcla de reacción de mutación.
WTC_IC_NO_CT (WT)	No hay ningún valor de C_T detectable para el control interno en el mismo tubo que el control nativo con la mezcla de reacción nativa.
WTC_LOW_CN	El número de copias del control nativo es demasiado bajo.
WTC_NO_CT (WT)	El valor de C_T no es detectable para el control nativo con la mezcla de reacción nativa.
WTC_NO_CN	No hay ningún número de copias para el control nativo.
WTC_NO_VALUE	El porcentaje de mutación del control nativo no presenta ningún valor.

Tabla 6. Indicadores de advertencia de muestras y descripción de los términos

Indicador	Descripción
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	La variación del porcentaje de fluorescencia para esta muestra en relación con el tubo de muestra con la mayor variación de fluorescencia es inferior al límite definido.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	La eficiencia de reacción de esta muestra no ha alcanzado un límite definido.
SPIKE	Se ha detectado un pico en la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación pero fuera de la región en la que se determina el valor de C_T .

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede resultarle de utilidad para resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de Preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions) de nuestro Centro de servicio técnico (Technical Support Center): www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga 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 "Información de contacto", en la página 46).

Para obtener información sobre la resolución de problemas de los kits de extracción QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104) y QIASymphony DNA DSP Mini (n.º de referencia 937236), consulte los manuales de uso correspondientes.

Comentarios y sugerencias

Extracción automática

Muestra marcada como "unclear" (dudosa)	Este problema puede deberse a una pausa realizada durante la serie de extracción. Si la serie de extracción se completó, prosiga con el paso de medición del cociente de la DO y de la concentración. En caso contrario, repita la serie de extracción.
Muestra marcada como "unprocessed" (sin procesar)	Este problema indica un error en el volumen de muestra inicial. Compruebe el volumen de sangre mediante pipeteo. Si el volumen es demasiado bajo, aumentelo hasta que el volumen de la muestra sea de 300 µl y vuelva a iniciar la serie.
Muestra marcada como "invalid" (no válida)	Se ha producido un error durante la serie de extracción. Repita el paso de extracción para esta muestra.
Error de temperatura del bloque de enfriamiento	Un mensaje de error al final de la serie sobre la temperatura de enfriamiento significa que las muestras se han mantenido a temperatura ambiente (15 °C-25 °C) desde el final de la serie de extracción. Si las muestras se han mantenido a temperatura ambiente durante < 12 horas, la calidad del ADN genómico no debería haberse alterado, por lo que el ADN genómico se podría cuantificar. Si se han mantenido a temperatura ambiente > 12 horas, las muestras de ADN genómico pueden haberse degradado. En este caso, repita la extracción.
Error de extracción de la placa de elución	Al final de la serie, puede aparecer un mensaje de error si la placa de elución se ha retirado sin comprobar la operación relevante en la pantalla. Para resolver este problema, haga clic en la casilla correspondiente.

Procedimiento general para la valoración del estado mutacional de JAK2 mediante el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR

El número de copias total es incorrecto y la muestra correspondiente no es válida: la amplificación es demasiado baja

- | | |
|--|---|
| a) Compruebe el cociente de A_{260}/A_{280} . | Si es <1,7, lleve a cabo una nueva extracción de ADN. |
| b) Compruebe la concentración de ADN. | El kit <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR está optimizado para una concentración de trabajo de 10 ng/µl. Si la concentración de ADN no se corresponde con esta concentración, diluya o vuelva a extraer el ADN de la sangre total. |
| c) Si ambos parámetros coinciden, los volúmenes de pipeteo pueden ser incorrectos. | Compruebe y vuelva a calibrar las pipetas antes de repetir el paso de qPCR. |

Error del control de la serie con respecto a un estándar de cuantificación

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Inversión del vial | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. |
| b) | Inversión durante la distribución | Almacene el contenido del kit entre -30 °C y -15 °C y mantenga las mezclas de reacción protegidas de la luz. |
| c) | Contaminación cruzada | Evite congelar y descongelar repetidamente. |
| d) | Degradación parcial del estándar | |
| e) | Degradación parcial de los reactivos de PCR | |
| f) | Amplificación no específica | |

Ausencia de señal o señal baja para un estándar

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Problema de distribución | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. |
| b) | Utilización de la misma mezcla de reacción para el QS de WT y MT | Repita la PCR. |

El control sin molde (NTC) de H₂O es positivo

- | | | |
|----|--------------------------------|---|
| a) | Contaminación cruzada | Sustituya todos los reactivos críticos. |
| b) | Contaminación de los reactivos | Manipule siempre las muestras, los componentes del kit y los fungibles según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación por arrastre. |
| c) | Inversión del tubo de tiras | Mantenga las mezclas de reacción protegidas de la luz. |
| d) | Degradación de la sonda | Compruebe si hay falsos positivos en la curva de fluorescencia. |

Ausencia de señal, ni siquiera en los controles estándar

Error de pipeteo u omisión de reactivos

Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.
Repita la PCR.

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

Efectos inhibidores del material de la muestra causados por una purificación insuficiente

Compruebe siempre la calidad del ADN mediante la medición del cociente de A_{260}/A_{280} y la concentración antes de empezar.

El control nativo (WTC) es positivo, pero el control de mutación (MTC) no es lo suficientemente positivo

Contaminación por arrastre

Sustituya todos los reactivos críticos.
Repita el experimento con nuevas alícuotas de todos los reactivos.
Manipule siempre las muestras, los componentes del kit y los fungibles según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación por arrastre.
Asegúrese de cambiar las puntas cada vez que pipetee reactivos distintos.

La señal del control nativo (WTC) o del control de mutación (MTC) utiliza mezclas de reacción recíprocas

- | | | |
|----|--------------------------------|---|
| a) | Contaminación cruzada | Sustituya todos los reactivos críticos. |
| b) | Contaminación de los reactivos | Repita el experimento con nuevas alícuotas de todos los reactivos. |
| c) | Inversión de los tubos | Manipule siempre las muestras, los componentes del kit y los fungibles según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación por arrastre. |
- Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.

Detección invertida del control positivo

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Contaminación cruzada | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. |
| b) | Inversión en la distribución de la mezcla de reacción en el tubo o en la premezcla | |

Sin señal para una muestra o control, incluso para el control interno

- | | | |
|----|---|---|
| a) | No se ha añadido la mezcla de reacción. | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Si no se amplifica el control interno, la mezcla de reacción no se ha añadido o está degradada. |
| b) | La mezcla de reacción se ha degradado. | Repita el paso de qPCR con la nueva mezcla de reacción. |

Nota: si el problema no puede atribuirse a ninguna de las causas mencionadas o si la medida correctora sugerida no permite resolver el problema, póngase en contacto con los servicios técnicos de QIAGEN para recibir asistencia.

Control de calidad

Se ha realizado un control de calidad completo en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Este kit se ha fabricado con arreglo a la norma ISO 13485:2012. Los certificados de los análisis pueden solicitarse en www.qiagen.com/support/.

Limitaciones

Este kit se ha diseñado para uso profesional.

Solo el personal especialmente formado y cualificado en las técnicas de biología molecular y que esté familiarizado con esta tecnología puede utilizar el producto.

Este kit debe utilizarse de acuerdo con las instrucciones recogidas en este manual, junto con un equipo validado especificado en “Materiales requeridos pero no suministrados”, en la página 9.

Debe prestar especial atención a las fechas de caducidad impresas en la etiqueta de la caja. No utilice componentes caducados.

Todos los reactivos suministrados con el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo kit. E El incumplimiento de esta directriz puede afectar al rendimiento.

El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR se ha validado únicamente para su uso con muestras de sangre total anticoagulada con EDTA de potasio obtenidas de pacientes con posibilidad de padecer NMP.

El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR se ha validado únicamente para su uso con el kit QIAasymphony DNA DSP Mini (n.º de referencia 937236) o el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104).

El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR está validado únicamente para el uso con los equipos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (para PCR) y QIAasymphony SP (para la preparación de muestras).

Cualquier uso no autorizado de este producto o modificación de los componentes eximirá a QIAGEN de posibles responsabilidades.

La interpretación de los resultados de diagnóstico obtenidos debe realizarse en combinación con otros resultados clínicos o de laboratorio. La ausencia de la mutación V617F/G1849T del gen JAK2 no descarta la existencia de otras mutaciones de dicho gen.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con los procedimientos utilizados en cada laboratorio que no estén contemplados en los estudios de rendimiento de QIAGEN.

Características de rendimiento

Límite de blanco

El límite de blanco (LOB) se ha determinado según el estándar EP17-2A del CLSI/NCCLS para muestras de sangre total sanas, con un estado de JAK2 nativo (30 muestras, 120 mediciones/lote, 3 lotes).

Los resultados del LOB se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Resumen de los resultados del límite de blanco

	LOB medido	Límite de blanco final
Lote de validación 1	0%	
Lote de validación 2	0%	0%
Lote de validación 3	0%	

Límite de detección

El límite de detección (LOD o sensibilidad analítica) se ha determinado según el "enfoque Probit" descrito en el estándar EP17-2A del CLSI/NCCLS. En este estudio, se analizaron 6 niveles bajos de mutación para 3 muestras independientes (ADN de sangre total con NMP añadido a ADN de sangre total nativa), con 3 lotes, 60 mediciones por muestra y mutación. Los resultados obtenidos indicaron una sensibilidad analítica del 0,042% para la mutación JAK2 V617F.

Los resultados del LOD se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los resultados del límite de detección

	LOD medido	Límite de detección final
Lote de validación 1	0,041%	
Lote de validación 2	0,029%	0,042%
Lote de validación 3	0,042%	

Linealidad

La linealidad de la cuantificación de la mutación JAK2 en pacientes con NMP se determinó a partir del estándar EPO6AE del CLSI/NCCLS, con un lote del kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR y con pruebas en 11 niveles de mutación para 5 ADN introducidos distintos. La cuantificación de la carga de mutación de JAK2 en muestras con NMP es lineal, es decir, el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR puede cuantificar muestras desde el valor del LOD hasta mutaciones del 100% siempre que la concentración de la muestra cuantificada se aproxime a 10 ng/μl (entre 5 y 20 ng/μl).

Repetibilidad y reproducibilidad

El estudio de precisión se realizó conforme al estándar EP5-A2 del CLSI/NCCLS. Las pruebas se llevaron a cabo en 11 niveles de mutación, con cada nivel analizado por duplicado en 54 series realizadas durante 27 días, lo que generó 108 mediciones por nivel de mutación. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Precision results

Muestra	Promedio del porcentaje de mutación de JAK2	SD _{R+}	SD _{SERIE++}	SD _{TOTAL+++}	CV _{TOTAL}
S1	72,67	1,99	2,99	5,45	7,50%
S2	53,96	2,48	3,16	6,52	12,09%
S3	23,13	1,59	1,95	4,51	19,52%
S4	11,97	1,10	1,17	2,79	23,27%
S5	6,01	0,71	0,63	1,57	26,17%
S6	2,39	0,31	0,36	0,70	29,23%
S7	1,23	0,17	0,16	0,34	27,38%
S8	0,63	0,13	0,12	0,24	37,88%
S9	0,13	0,05	0,03	0,07	52,31%
S10	0,07	0,03	0,02	0,04	65,01%
S11	0,007	0,01	0,002	0,01	146,84%

R+: repetibilidad.

SERIE++: reproducibilidad entre series.

TOTAL+++: precisión total (incluida entre equipos, operadores y lotes).

CV_{TOTAL}: coeficiente de variación de la precisión total (% de MT de JAK2).

Sustancias interferentes

El diseño del estudio se basó en recomendaciones descritas en el estándar EP7 A2 del NCCLS “Interference Testing in clinical Chemistry” (pruebas de interferencias en química clínica). Se seleccionaron un total de 17 sustancias que podían estar presentes en muestras de sangre por su posible efecto en la PCR: busulfán, hidrobromuro de citalopram, hemihidrato de hidrocloreuro de paroxetina, hidrocloreuro de sertralina, hidrocloreuro de fluoxetina, acetaminofeno (paracetamol), bilirrubina no conjugada, EDTA de potasio, Hgb (humana), triglicéridos, lisinopril dihidrato, hidroxiurea, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, tiotepa, anagrelida, interferón alfa 2b. Los resultados obtenidos no mostraron efectos interferentes con estas sustancias.

Validación clínica y comparación de métodos

Se realizó un estudio que incluía 65 muestras de sangre con NMP en 2 centros clínicos franceses para comparar el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR con el kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant® de QIAGEN, utilizado como método de referencia.

Se congelaron y descongelaron un total de 65 muestras de sangre con NMP, a las que posteriormente se les extrajo ADN genómico. Todas las muestras pasaron controles de calidad del ADN en ambos métodos de extracción de ADN genómico.

Los porcentajes medidos de las mutaciones de JAK2 de ambos métodos se compararon mediante la regresión de Deming. Existe una fuerte correlación entre el método de referencia y el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR para muestras con mutaciones de JAK2 con niveles de mutación del 0% al 95% ($R^2=0,969$), tal como se muestra en la Ilustración 4.

Porcentaje de mutación

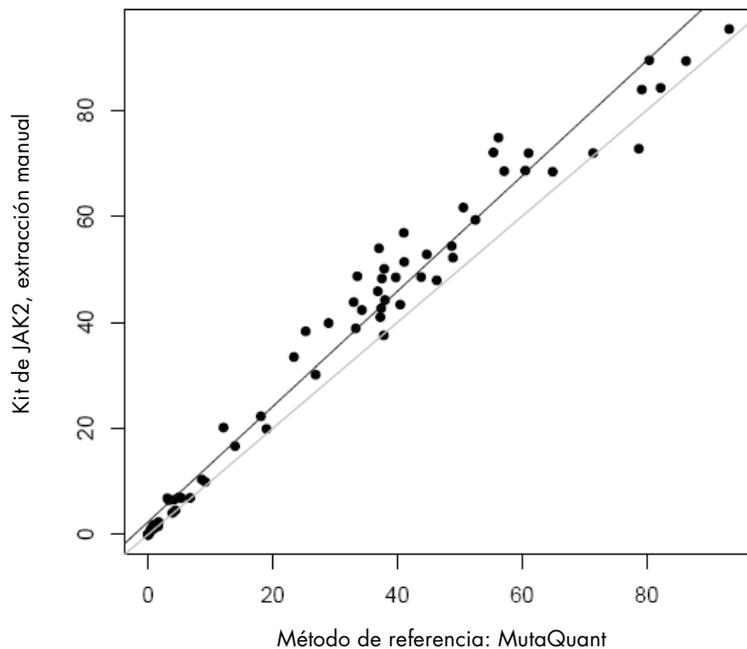


Ilustración 4. Gráfica de los porcentajes de mutación de JAK2 V617F obtenidos con el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR y un método de referencia en las mismas muestras.

De forma global, los porcentajes de mutación de JAK2 obtenidos con el kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR fueron superiores a los porcentajes obtenidos con el método de referencia, lo cual indica una mayor sensibilidad de este nuevo kit (~ 1log) (9).

Referencias

1. James C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
2. Levine R.L., et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
3. Kralovics R., et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
4. Baxter E.J., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
5. Tefferi A., et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
6. Prchal J.F. and Axelrad A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
7. Tefferi A. and Vardiman J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, **22**, 14.
8. Lippert E. et al. (2014) Clinical and biological characterization of patients with low (0.1-2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica*. **99**, e98.
9. Jovanovic J., et al (2013) Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2V617F associated myeloproliferative neoplasms: A joint European LeukemiaNet/MPN&MPN-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia* **27**, 2032.

Símbolos

Los símbolos siguientes pueden aparecer en el embalaje y las etiquetas:



Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones



Fecha de caducidad



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Número de referencia



Número de lote



Número de material



Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Fabricante



Proteger de la luz



Consultar las instrucciones de uso



Advertencia

Información de contacto

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

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º ref.
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: control nativo del gen JAK2, control de V617F de JAK2, estándares de cuantificación WT de JAK2, estándares de cuantificación MT de JAK2, mezcla de reacción WT de JAK2, mezcla de reacción MT de JAK2, Taq ADN polimerasa, tampón TE para dilución, agua para el NTC	673623
Rotor-Gene Q MDx: para el análisis de PCR en tiempo real validado para IVD en aplicaciones clínicas		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de fusión de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de fusión de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Software para la realización de pruebas rutinarias en combinación con el equipo Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Software de una única licencia para la instalación en un ordenador	9025620
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloque de aluminio para la configuración de reacción manual con pipeta de un solo canal en tubos de 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos y tapones para 1.000 reacciones	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapones para 10.000 reacciones	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparados: columnas QIAamp Mini Spin, tampones, reactivos, tubos, equipos VacConnectors	61104
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit	Para 192 preparaciones de 200 µl cada una: incluye 2 cartuchos de reactivos, bandejas para enzimas y accesorios	937236
QIAsymphony SP y accesorios		
QIAsymphony SP System	Módulo de preparación de muestras QIAsymphony: incluye instalación y formación, así como 1 año de garantía en piezas y mano de obra	9001751
QIAsymphony SP	Módulo de preparación de muestras QIAsymphony: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Cartuchos para la preparación de muestras de 8 pocillos para su uso con QIAsymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Tapas de 8 ruedas para su uso con QIAsymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Puntas con filtro desechables, en bandejas; (8 x 128). Para uso con QIAcube® y los equipos QIAsymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Puntas con filtro desechables, en bandejas; (8 x 128). Para uso con los equipos QIAsymphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Tubos de polipropileno no estériles (0,85 ml de capacidad máxima, menos de 0,7 ml de capacidad de almacenamiento, 0,4 ml de capacidad de elución); 2.304 en bandejas de 96; incluye tiras de tapones	19588

RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7.000 unidades/ml, solución)
Buffer ATL (200 ml)	200 ml de tampón de lisis para tejidos para 1.000 preparaciones

19101

19076

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de usuario o el manual de uso del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales de usuario y los manuales de uso de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com y también pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Este producto está destinado para el diagnóstico in vitro. Los productos *ipsogen* no deben ser revendidos, modificados para reventa ni utilizados para fabricar otros productos comerciales sin 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 aparecer 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 JAK2 V617F 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 JAK2 V617F. QIAGEN desarrolla programas de licencia específicos para tales usos. Póngase en contacto con nuestro departamento jurídico a través de jak2licenses@qiagen.com.

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

Acuerdo de licencia limitada

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario de los kits *ipsogen* JAK2 RGQ PCR la aceptación de los siguientes términos:

1. El kit *ipsogen* JAK2 RGQ PCR se utiliza exclusivamente de acuerdo con el *Manual del kit ipsogen JAK2 RGQ PCR* y solo para uso con los componentes que se incluyen en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en estos kits con componentes no incluidos en los mismos, excepto según se describe en el *Manual del kit ipsogen JAK2 RGQ PCR* y en protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
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 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 las costas judiciales, incluidos los honorarios de abogacía, por cualquier acción emprendida para garantizar el cumplimiento de este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual con relación a este kit y con sus componentes.

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

HB-1829-005 1107956 157038730 © 2017 QIAGEN, Reservados todos los derechos.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Servicio técnico support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com