

Junio de 2016

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



Versión 1

IVD

Diagnóstico *in vitro* cualitativo

Para utilizar con los instrumentos Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] y LightCycler[®]



REF

673823



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R4

MAT

1072502ES



Sample & Assay Technologies

QIAGEN: Sample and Assay Technologies

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

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:

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

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

Contenido

Resumen y explicación	4
Principios del procedimiento	6
Materiales suministrados	9
Contenido del kit	9
Materiales necesarios pero no suministrados	10
Advertencias y precauciones	11
Precauciones generales	11
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	12
Procedimiento	13
Preparación del ADN de las muestras	13
Almacenamiento de ácidos nucleicos	13
Protocolos	
■ Protocolo: qPCR en un instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o RotorGene Q 5plex HRM con rotor para 72 tubos	14
■ Protocolo: qPCR en instrumentos Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT o LightCycler 480	18
■ Protocolo: qPCR en el instrumento LightCycler 1.2	23
Interpretación de los resultados	27
Cálculo de $\Delta\Delta C_T$ (o $\Delta\Delta C_p$) y genotipado	27
Controles	30
Guía de resolución de problemas	31
Control de calidad	34
Limitaciones	34
Características del rendimiento	34
Estudios no clínicos	34
Estudios clínicos	37
Referencias bibliográficas	38
Símbolos	39
Información de contacto	39
Información para pedidos	40

Uso previsto

El kit *ipsogen JAK2 MutaSearch* está concebido para la detección de la mutación V617F/G1849T del gen JAK2 en el ADN genómico de sujetos con posible neoplasia mieloproliferativa. La ausencia de la mutación V617F/G1849T del gen JAK2 no descarta la existencia de otras mutaciones de dicho gen. En el caso de que existan otras mutaciones en los nucleótidos 88.504 a 88.504, el análisis puede dar resultados negativos falsos (ref. NCBI: NT_008413).

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

Resumen y explicación

En 2005 (1-4) se identificó una mutación somática recurrente, V617F, que afecta al gen de la tirosinquinasa Janus 2 (JAK2), lo cual dio lugar a un importante avance en la comprensión, la clasificación y el diagnóstico de las neoplasias mieloproliferativas (NMP). JAK2 es una molécula de señalización intracelular fundamental para diversas citocinas, incluida la eritropoyetina.

La mutación V617F del gen JAK2 se detecta en > 95% de los pacientes con policitemia vera (PV), en el 50-60% de los pacientes con trombocitemia esencial (TE) y en el 50% de los pacientes con mielofibrosis primaria (MFP). También se ha detectado la mutación V617F del gen JAK2 en algunos casos raros de leucemia mielomonocítica crónica, síndrome mielodisplásico, mastocitosis sistémica y leucemia neutrófila crónica, pero en el 0% de los casos de leucemia mieloide crónica (LMC) (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 fenilalanina (F) en la posición 617 de la proteína (dominio JH2). Da lugar a activación constitutiva del JAK2, transformación hematopoyética *in vitro* y crecimiento de colonias eritroides independientes de la eritropoyetina (CEE) en todos los pacientes con PV y en una gran proporción de los pacientes con TE y MFP (6). La mutación V617F del gen JAK2 representa un inductor esencial en la transformación de las células hematopoyéticas en las NMP, pero todavía no se han identificado completamente los mecanismos patológicos exactos que dan lugar, con la misma mutación aislada, a estas entidades clínicas y biológicas tan distintas.

Tradicionalmente, el diagnóstico de las NMP se basaba en criterios clínicos, criterios histológicos de la médula ósea y criterios citogenéticos. El descubrimiento de un marcador molecular específico de la enfermedad ha simplificado el proceso y ha permitido mejorar la exactitud diagnóstica. La

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

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

Criterios para un diagnóstico de policitemia vera (PV)	
Mayores	<ol style="list-style-type: none"> Hemoglobina (Hb) > 18,5 g·dl⁻¹ (hombres) o > 16,5 g·dl⁻¹ (mujeres), o Hb o hematocrito (Hct) > percentil 99 del intervalo de referencia para la edad, el sexo o la altitud de residencia, o Hb > 17 g·dl⁻¹ (hombres) o > 15 g·dl⁻¹ (mujeres) si se asocia a un aumento mantenido de ≥ 2 g·dl⁻¹ con respecto al valor basal que no puede atribuirse a la corrección de una ferropenia, o Elevación de la masa eritrocitaria > 25% por encima del valor previsto normal medio. Presencia de la mutación <i>JAK2V617F</i> o de una mutación similar.
Menores	<ol style="list-style-type: none"> Mieloproliferación de las tres líneas celulares de la médula ósea. Nivel de eritropoyetina sérica inferior al intervalo normal. Crecimiento de colonias eritroides endógenas (CEE).
Criterios para un diagnóstico de trombocitemia esencial (TE)	
Mayores	<ol style="list-style-type: none"> Recuento de plaquetas ≥ 450 x 10⁹ l⁻¹. Proliferación de megacariocitos con morfología grande y madura. Proliferación granulocítica o eritroide ausente o escasa. No se cumplen los criterios de la OMS para la leucemia mieloide crónica (LMC), la PV, la mielofibrosis primaria (MFP), los síndromes mielodisplásicos (SMD) u otras neoplasias mieloides. Demostración de la mutación <i>JAK2V617F</i> o de otro marcador clonal, o Ausencia de signos de trombocitosis reactiva.
Menores	-

La tabla continúa en la página siguiente

Continuación de la tabla 1

Criterios para un diagnóstico de mielofibrosis primaria (MFP)	
Mayores	<ol style="list-style-type: none">1. Proliferación megacariocítica y atipia acompañadas de fibrosis reticulínica y/o colágena, o En ausencia de fibrosis reticulínica, los cambios en los megacariocitos deben acompañarse de un aumento de la celularidad de la médula ósea, proliferación granulocítica y, a menudo, disminución de la eritropoyesis (es decir, MFP prefibrótica).2. No se cumplen los criterios de la OMS para LMC, PV, SMD u otras neoplasias mieloides.3. Demostración de la mutación JAK2V617F o de otro marcador clonal, o Ausencia de signos de fibrosis medular reactiva.
Menores	<ol style="list-style-type: none">1. Leucoeritroblastosis.2. Elevación de la lactato-deshidrogenasa (LDH) sérica.3. Anemia.4. Esplenomegalia palpable.

Además, el valor de corte del 1% para la tasa de positividad clínica con ensayos basados en PCR está recibiendo actualmente un mayor apoyo entre los expertos de Europa y Estados Unidos (8-10).

Principios del procedimiento

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*) permite la cuantificación exacta de los productos de la PCR durante la fase exponencial del proceso de amplificación con PCR. Es posible obtener rápidamente datos de la PCR cuantitativa sin necesidad de un procesamiento posterior a la PCR mediante la detección en tiempo real de señales fluorescentes durante los ciclos de PCR y después de estos, reduciendo así considerablemente el riesgo de contaminación con productos de la PCR. Actualmente se dispone de 3 tipos principales de técnicas de qPCR: análisis de qPCR con colorante SYBR® Green I, análisis de qPCR con sondas de hidrólisis y análisis de qPCR con sondas de hibridación.

Este ensayo aprovecha el principio de la hidrólisis de oligonucleótidos con doble colorante para qPCR. Durante la PCR, primers directos e inversos se hibridan con una secuencia específica. La misma mezcla contiene un oligonucleótido con doble colorante. Esta sonda, que consta de un oligonucleótido marcado con un colorante indicador en el extremo 5' y un colorante extintor de fluorescencia en el extremo 3', se hibrida con una secuencia diana dentro del producto de la PCR. El análisis de qPCR con sondas

de hidrólisis aprovecha la actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN-polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq). Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante indicador al colorante extintor de fluorescencia provoca la supresión de la fluorescencia del indicador principalmente por transferencia de energía de tipo Förster.

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

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

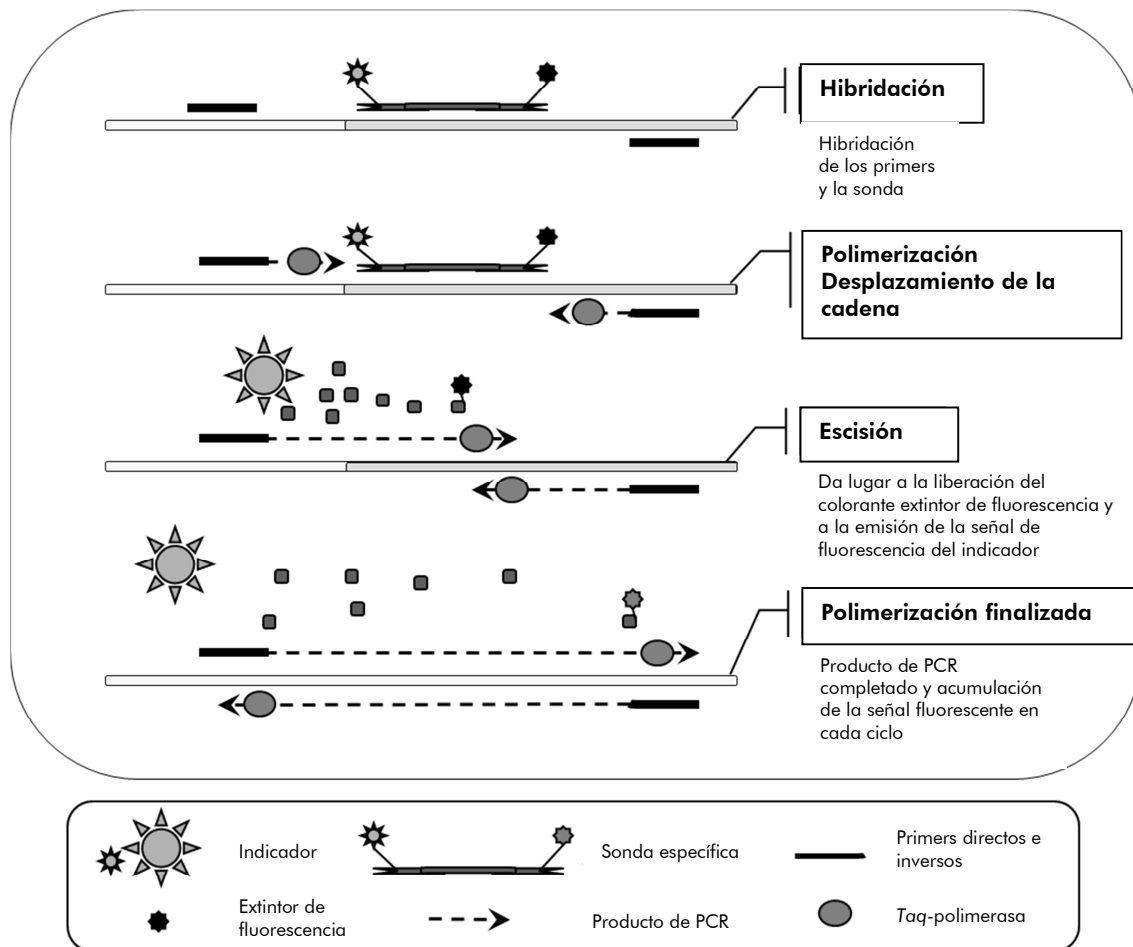


Figura 1. Principio de la reacción.

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

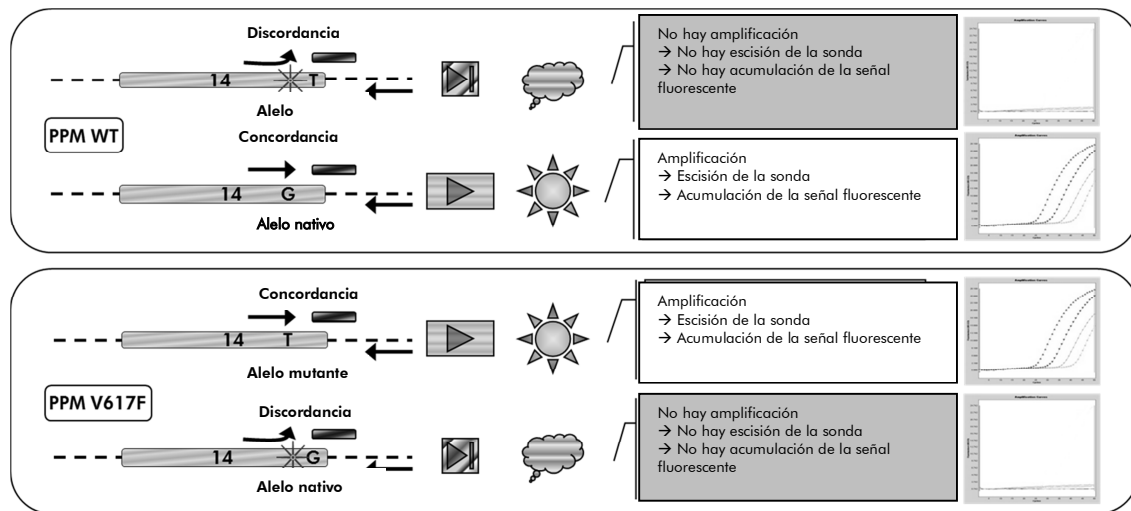


Figura 2. PCR específica del alelo. El empleo de la mezcla de primers y sonda para el alelo nativo o para el alelo V617F permite la detección específica del alelo nativo o mutante en dos reacciones distintas realizadas con la misma muestra.

Materiales suministrados

Contenido del kit

<i>ipsogen JAK2 MutaSearch Kit</i>		(24)
N.º de referencia		673823
Número de reacciones		24
V617F Positive Control (control positivo de V617F)	PC-VF JAK2	40 µl
V617F Negative Control (control negativo de V617F)	NC-VF JAK2	40 µl
Cut-Off Sample (1% V617F alelo)	COS-VF JAK2	40 µl
Primers and probe mix JAK2 V617F* (mezcla de primers y sonda para la mutación V617F del gen JAK2)	PPM-JAK2 V617F 25x	68 µl
Primers and probe mix JAK2 WT† (mezcla de primers y sonda para el alelo nativo del gen JAK2)	PPM-JAK2 WT 25x	68 µl
<i>ipsogen JAK2 MutaSearch Kit Handbook</i> (inglés)		1

* Mezcla de primers inversos y directos específicos para el gen *JAK2*, sonda FAM-TAMRA específica del alelo V617F.

† Mezcla de primers inversos y directos específicos para el gen *JAK2*, sonda FAM-TAMRA específica del alelo nativo.

Nota: Centrifugar brevemente los tubos antes de usarlos.

Nota: Para analizar muestras desconocidas con el kit *ipsogen JAK2 MutaSearch* es necesario extraer ADN genómico. Los reactivos necesarios para realizar la extracción del ADN no se suministran y deben ser validados junto con el kit.

Materiales necesarios pero no suministrados

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

Reactivos

- Agua libre de nucleasas apta para PCR
- Tampón TE 1x libre de nucleasas, pH 8,0
- Tampón y ADN-polimerasa *Taq*: los reactivos validados son TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (mezcla maestra para PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc.,, n.º de referencia 4304437) y LightCycler TaqMan Master (mezcla maestra para PCR 5x) (Roche, n.º de referencia 04535286001) o LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe[®] (mezcla maestra 5x) (Roche, n.º de referencia 03515567001)

Nota: Esta mezcla maestra únicamente puede utilizarse para LightCycler 1.2

- Reactivos para gel de agarosa al 0,8-1% en tampón TBE para electroforesis 0,5x

Consumibles

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

Equipo

- Pipetas graduadas en microlitros* dedicadas exclusivamente para PCR (1-10 μ l; 10-100 μ l; 100-1000 μ l)
- Centrifugadora de mesa* con rotor para tubos de reacción de 1,5 ml/0,5 ml (con capacidad para centrifugar a 10.000 rpm)
- Espectrofotómetro* para cuantificación de ADN
- Instrumento de PCR en tiempo real*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM u otros instrumentos Rotor-Gene Q, LightCycler 1.2 o 480, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System o ABI PRISM 7900HT SDS y sus correspondientes materiales específicos

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

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*

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

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

Precauciones generales

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

Este kit está indicado para uso diagnóstico *in vitro*. Los reactivos y las instrucciones suministrados con este kit han sido validados para ofrecer un rendimiento óptimo. La dilución excesiva de los reactivos o un cambio en los tiempos y las temperaturas de incubación pueden causar resultados erróneos o dispares. Los reactivos PPM-JAK2 pueden alterarse si se exponen a la luz. Todos los reactivos están formulados de manera específica para su utilización en este análisis. No deben sustituirse si se desea obtener un resultado óptimo del análisis.

Tenga la máxima precaución para evitar:

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

Por lo tanto, recomendamos lo siguiente:

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

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

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

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

- Reducir al mínimo la exposición a la luz de las mezclas de primers y sonda (tubos PPM-JAK2).
- Mezclar suavemente y centrifugar los tubos antes de abrirlos.
- Guardar todos los componentes del kit en los envases originales.

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

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

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

Procedimiento

Preparación del ADN de las muestras

El ADN genómico debe proceder de sangre completa, de linfocitos de sangre periférica purificados, de polimorfonucleares o de granulocitos. Para poder comparar resultados, recomendamos adoptar el mismo método de fraccionamiento celular y de extracción del ADN. La extracción del ADN puede realizarse por cualquier método comercial o propio.

La cantidad de ADN se determina midiendo la densidad óptica a 260 nm. La calidad del ADN se evaluará mediante espectrofotometría o mediante electroforesis en gel.

El cociente O_{260}/O_{280} debe ser de 1,7-1,9. Los cocientes inferiores a este intervalo generalmente indican contaminación por proteínas o por sustancias químicas orgánicas. El análisis electroforético en un gel de agarosa al 0,8-1,0% debe permitir visualizar el ADN aislado como una banda nítida de unas 20 kb. Una ligera mancha es aceptable.

El ADN resultante se diluye hasta 5 ng/ μ l en tampón TE. La reacción de qPCR está optimizada para 25 ng de ADN genómico purificado.

Almacenamiento de ácidos nucleicos

Para el almacenamiento a corto plazo durante un máximo de 24 horas, recomendamos almacenar los ácidos nucleicos purificados a una temperatura de 2-8 °C. Para un tiempo de almacenamiento superior a 24 horas, recomendamos una temperatura de almacenamiento de -20 °C.

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

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

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

Muestras	Reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo V617F del gen JAK2 (PPM-JAK2 V617F)	
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
3 controles de ADN	6 reacciones (PC-VF, NC-VF y COS-VF, cada uno analizado por duplicado)
Control de agua	2 reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo nativo del gen JAK2 (PPM-JAK2 WT)	
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
3 controles de ADN	6 reacciones (PC-VF, NC-VF y COS-VF, cada uno analizado por duplicado)
Control de agua	2 reacciones

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

Recomendamos analizar como mínimo 12 muestras de ADN en el mismo experimento para optimizar el uso de los controles y de las mezclas de primers y sonda. El esquema del rotor representado en la figura 3 muestra un ejemplo de este experimento.

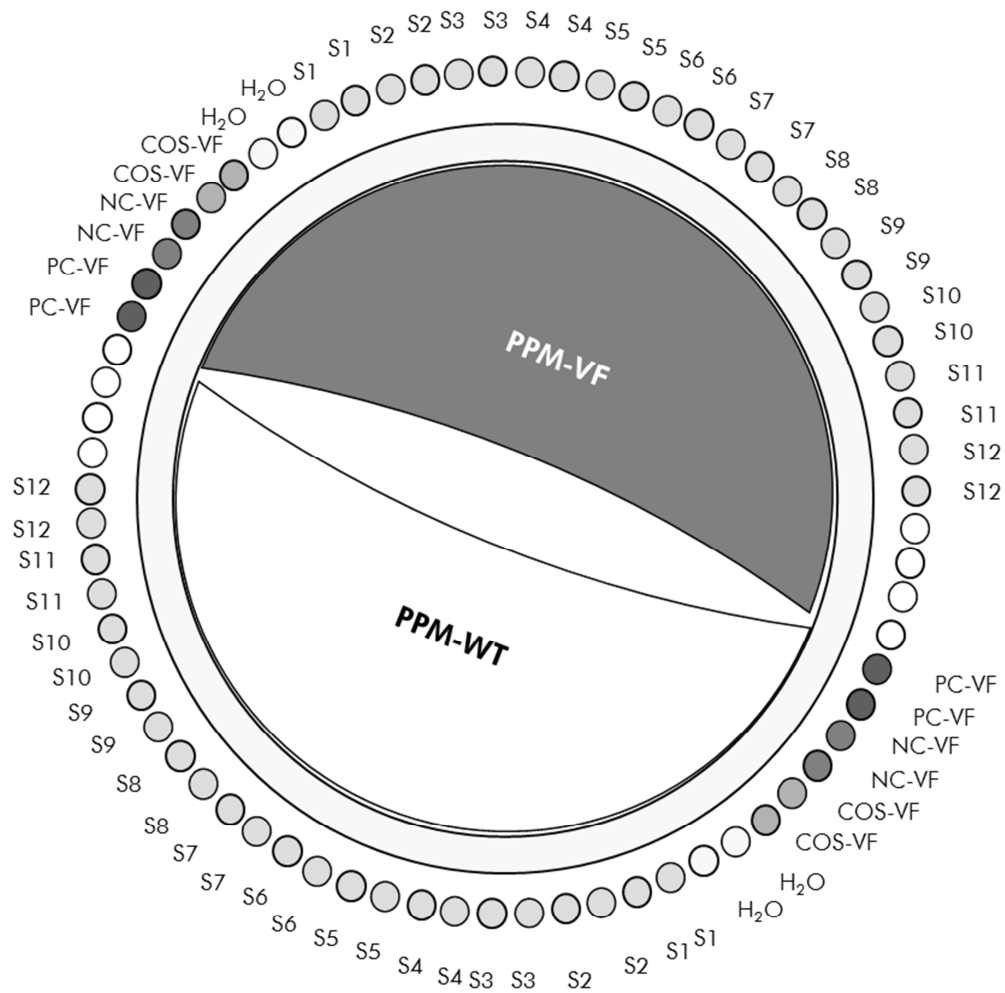


Figura 3. Disposición recomendada del rotor para un experimento con el kit *ipsogen JAK2 MutaSearch*. PC-VF: control positivo; NC-VF: control negativo; COS-VF: muestra discriminadora; S: muestra de ADN; H₂O: control de agua.

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

Colocar tubos vacíos en todas las demás posiciones.

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

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

Procedimiento

1. Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.

Los componentes deben sacarse del congelador unos 10 min antes de comenzar el procedimiento.

2. Mezclar en vórtex y centrifugar brevemente todos los tubos (durante aproximadamente 10 s a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo).
3. Preparar 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 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculada para lograr un volumen de reacción final de 25 μ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda. Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 3. Preparación de las mezclas de qPCR.

Componente	1 reacción (μl)	VF: 32 + 1 reacciones (μl)	WT: 32 + 1 reacciones (μl)	Concentración final
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Mezcla de primers y sonda, 25x (VF o WT, respectivamente)	1	33	33	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6,5	214,5	214,5	–
Muestra (se añadirá en el paso 6)	5	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	25	25 para cada una	25 para cada una	–

4. Mezclar en vórtex y centrifugar brevemente cada mezcla de qPCR (VF y WT) (durante aproximadamente 10 s a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo).
5. Poner 20 μ l de la premezcla de qPCR respectiva (VF o WT) por tubo.

6. **Agregar 5 μ l del material de ADN de muestra o de controles en el tubo correspondiente (volumen total, 25 μ l).**
7. **Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.**
8. **Cerrar los tubos de PCR. Colocar los tubos en el rotor para 72 tubos conforme a las recomendaciones del fabricante. Colocar tubos vacíos en todas las demás posiciones.**
9. **Programar el instrumento Rotor-Gene Q con el programa de termociclado según se indica en la tabla 4.**

Tabla 4. Perfil de temperatura.

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

10. **Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 4.**
11. **Para instrumentos Rotor-Gene Q, seleccionar "Slope Correct" (corrección de pendiente) para el análisis. Recomendamos fijar el umbral en 0,03.**

Protocolo: qPCR en instrumentos Applied Biosystems7500, ABI PRISM 7900HT o LightCycler 480

Si se emplea un equipo de qPCR con placa de 96 pocillos, recomendamos realizar todas las mediciones por duplicado, como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Número de reacciones para los instrumentos Applied Biosystems7500, ABI PRISM 7900HT o LightCycler 480.

Muestras	Reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo V617F del gen JAK2 (PPM-JAK2 V617F)	
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
3 controles de ADN	6 reacciones (PC-VF, NC-VF y COS-VF, cada uno analizado por duplicado)
Control de agua	2 reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo nativo del gen JAK2 (PPM-JAK2 WT)	
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
3 controles de ADN	6 reacciones (PC-VF, NC-VF y COS-VF, cada uno analizado por duplicado)
Control de agua	2 reacciones

Procesamiento de las muestras en los instrumentos Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT o LightCycler 480

Recomendamos analizar como mínimo 12 muestras de ADN en el mismo experimento para optimizar el uso de los controles y de las mezclas de primers y sonda. El esquema de la placa representado en la figura 4 muestra un ejemplo de este experimento.

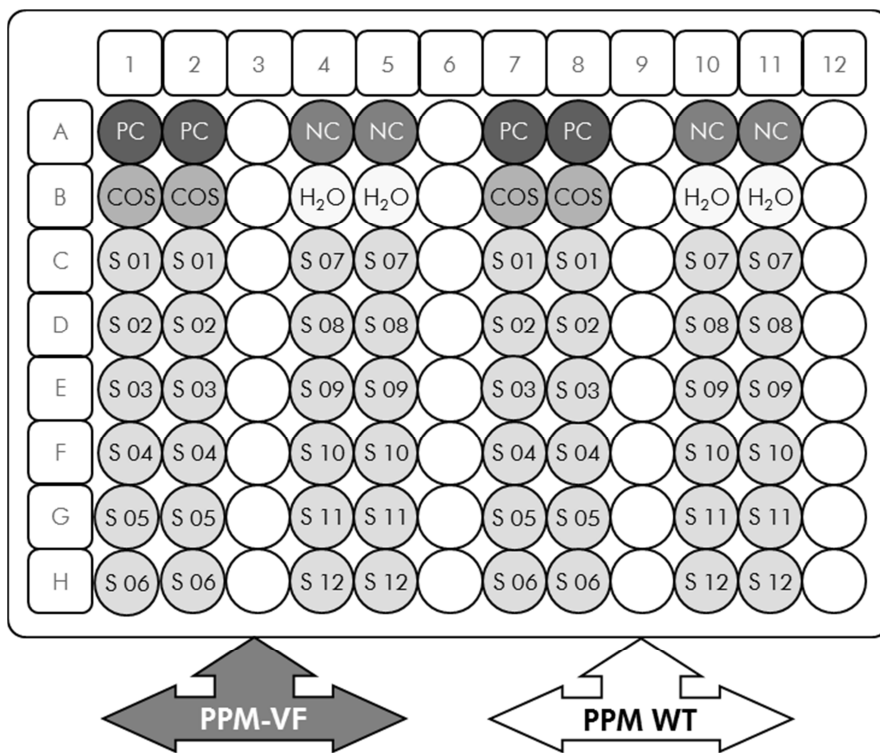


Figura 4. Disposición recomendada de la placa para un experimento con el kit *ipsogen JAK2 MutaSearch*. PC: control positivo; NC: control negativo; COS: muestra discriminadora; S: muestra de ADN; H₂O: control de agua.

qPCR en los instrumentos Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT o LightCycler 480

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

Procedimiento

- 1. Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
Los componentes deben sacarse del congelador unos 10 min antes de comenzar el procedimiento.
- 2. Mezclar en vórtex y centrifugar brevemente todos los tubos (durante aproximadamente 10 s a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo).**
- 3. Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.**

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

En la tabla 6 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculada para lograr un volumen de reacción final de 25 μ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda. Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 6. Preparación de la mezcla de qPCR.

Componente	1 reacción (μl)	VF: 32 + 1 reacciones (μl)	WT: 32 + 1 reacciones (μl)	Concentración final
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	412.5	412.5	1x
Mezcla de primers y sonda, 25x (VF o WT, respectivamente)	1	33	33	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6.5	214.5	214.5	–
Muestra (se añadirá en el paso 6)	5	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	25	25 para cada una	25 para cada una	–

4. **Mezclar en vórtex y centrifugar brevemente cada mezcla de qPCR (VF y WT) (durante aproximadamente 10 s a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo).**
5. **Poner 20 μ l de la premezcla de qPCR respectiva (VF o WT) por pocillo.**
6. **Agregar 5 μ l del material de ADN de muestra o de controles en el pocillo correspondiente (volumen total, 25 μ l).**
7. **Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.**
8. **Cerrar la placa y centrifugar brevemente (300 x g durante aproximadamente 10 s).**
9. **Colocar la placa en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante.**
10. **Programar el termociclador con el programa de termociclado según se indica en la tabla 7 para los instrumentos Applied Biosystems 7500 y ABI PRISM 7900HT SDS o según se indica en la tabla 8 para el instrumento LightCycler 480.**

Tabla 7. Perfil de temperatura para los instrumentos Applied Biosystems 7500 y ABI PRISM 7900HT SDS.

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

Tabla 8. Perfil de temperatura para el instrumento LightCycler 480.

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

11. Para los instrumentos Applied Biosystems 7500 y ABI PRISM 7900HT SDS, seguir el paso 11a. Para el instrumento LightCycler 480, seguir el paso 11b.

- 11a. Applied Biosystems 7500 y ABI PRISM 7900HT SDS:**
recomendamos fijar el umbral en 0,1 en el paso de análisis. Iniciar el programa de ciclado según se indica en la tabla 7.
- 11b. Instrumento LightCycler 480:** recomendamos el modo "Fit point analysis" (análisis del punto de ajuste) con fondo en 2,0 y umbral en 2,0. Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 8.

Protocolo: qPCR en el instrumento LightCycler 1.2

Si se emplean instrumentos para capilares, recomendamos medir las muestras por duplicado y los controles una sola vez, según se indica en la tabla 9.

Tabla 9. Número de reacciones para el instrumento LightCycler 1.2.

Muestras	Reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo V617F del gen JAK2 (PPM-JAK2 V617F)	
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
3 controles de ADN	3 reacciones (PC-VF, NC-VF y COS-VF, cada uno analizado una vez)
Control de agua	1 reacción
Con la mezcla de primers y sonda para el alelo nativo del gen JAK2 (PPM-JAK2 WT)	
n muestras de ADN	n x 2 reacciones
3 controles de ADN	3 reacciones (PC-VF, NC-VF y COS-VF, cada uno analizado una vez)
Control de agua	1 reacción

Procesamiento de las muestras en el instrumento LightCycler 1.2

Recomendamos analizar 6 muestras de ADN en el mismo experimento con el fin de optimizar el empleo de los controles y de las mezclas de primers y sonda. El esquema de capilares representado en la figura 5 muestra un ejemplo de este experimento.

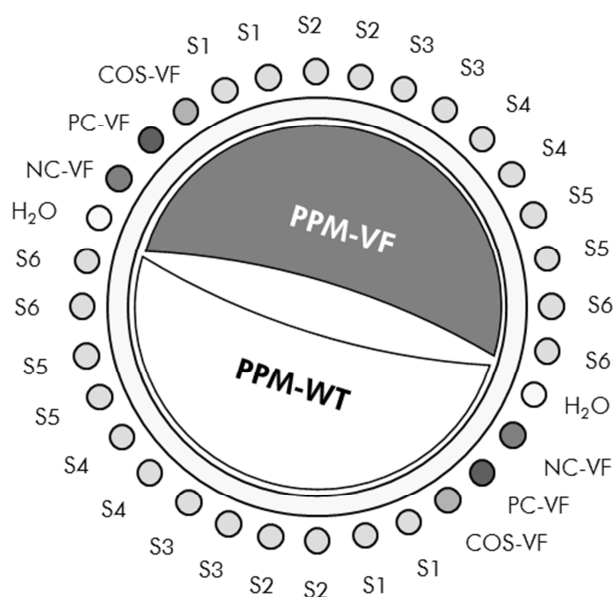


Figura 5. Disposición recomendada del rotor para un experimento con el kit ipsogen JAK2 MutaSearch. PC-VF: control positivo; NC-VF: control negativo; COS-VF: muestra discriminadora; S: muestra de ADN; H₂O: control de agua.

qPCR en el instrumento LightCycler 1.2

Nota: Debido a requisitos tecnológicos particulares, los experimentos con el instrumento LightCycler 1.2 tienen que realizarse con reactivos específicos. Recomendamos emplear el reactivo LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe y seguir las instrucciones del fabricante para preparar la mezcla maestra 5x.

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

Procedimiento

1. Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.

Los componentes deben sacarse del congelador unos 10 min antes de comenzar el procedimiento.

2. Mezclar en vórtex y centrifugar brevemente todos los tubos (durante aproximadamente 10 s a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo).

3. Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.

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

En la tabla 10 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculada para lograr un volumen de reacción final de 20 μ l. Puede prepararse una premezcla según el número de

reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda. Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 10. Preparación de la mezcla de qPCR.

Componente	1 reacción (μl)	VF: 16 + 1 reacciones (μl)	WT: 16 + 1 reacciones (μl)	Concentración final
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe, 5x	4	68	68	1x
Mezcla de primers y sonda, 25x (VF o WT, respectivamente)	0,8	13,6	13,6	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	10,2	173,4	173,4	–
Muestra (se añadirá en el paso 6)	5	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	20	20 para cada una	20 para cada una	–

4. **Mezclar en vórtex y centrifugar brevemente cada mezcla de qPCR (VF y WT) (durante aproximadamente 10 s a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo).**
5. **Poner 15 μ l de la premezcla de qPCR respectiva (VF o WT) por capilar.**
6. **Agregar 5 μ l del material de ADN de muestra o de controles en el capilar correspondiente (volumen total, 20 μ l).**
7. **Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.**
8. **Cerrar los capilares y centrifugar brevemente (500 x g durante aproximadamente 5 s).**
9. **Colocar los capilares en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante.**

10. Programar el instrumento LightCycler 1.2 con el programa de termociclado según se indica en la tabla 11.

Tabla 11. Perfil de temperatura.

Modo de análisis	Cuantificación
Espera 1	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 min
Ciclo	50 veces 95 °C durante 15 s 66°C durante 1 min, con adquisición de fluorescencia FAM: Single

11. Para el instrumento LightCycler 1.2 se recomienda el modo F1/F2 y "2nd derivative analysis" (segundo análisis derivativo). Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 11.

Interpretación de los resultados

Cálculo de $\Delta\Delta C_T$ (o $\Delta\Delta C_p$) y genotipado

Extraer los datos exportados del archivo Analyze Export File (archivo de exportación para análisis) generado por el sistema y analizar los resultados tal como se describe a continuación.

Nota: Los valores de C_T son resultados obtenidos con los sistemas Rotor-Gene, Applied Biosystems y ABI PRISM. Los valores de C_T pueden sustituirse en la descripción siguiente por los valores de C_p obtenidos con los sistemas LightCycler. Se presentan los cálculos de los valores de C_T , que pueden aplicarse de la misma forma a los valores de C_p .

IMPORTANTE: Si no se observa amplificación (es decir, un resultado “no detectada”, $C_T > 45$ o $C_p > 45$, según el instrumento empleado) para las mezclas PPM-JAK2 WT y PPM-JAK2 VF, no pueden analizarse los resultados. Estos resultados indican que la concentración de ADN de la muestra no estaba dentro del intervalo aceptable o que se ha omitido la matriz de ADN. De lo contrario, realice el análisis tal como se describe a continuación.

Procedimiento

- 1. Calcular el valor medio de C_T obtenido con la mezcla PPM-JAK2 V617F (valor medio de C_T VF) y con la mezcla PPM-JAK2 WT (valor medio de C_T WT) para cada muestra (controles, muestra discriminadora y muestras desconocidas).**

Si uno de los duplicados para una muestra tiene un valor “indeterminado”, no debe tenerse en cuenta: utilice únicamente los valores obtenidos para el otro duplicado. En este caso, recomendamos encarecidamente volver a analizar la muestra.

Si los dos duplicados tienen un valor indeterminado, ajuste el valor de la muestra en 45.

- 2. Calcule el límite de cantidad de muestra (IL, input limit) conforme al esquema indicado a continuación.**

Límite de cantidad de muestra (IL) = Valor medio de C_T WT para COS + 3,3

Nota: El límite de cantidad de muestra permite verificar que la muestra de ADN del paciente utilizada para la prueba se ha manipulado correctamente para poder garantizar los resultados finales del alelo V617F del gen JAK obtenidos.

3. Compruebe la calidad de la muestra para cada muestra desconocida según se indica en la tabla 12.

Tabla 12. Criterios para la calidad de la muestra.

Si:	Haga lo siguiente:
Valor medio de C_T VF < 40	Continúe en el paso 4.
Valor medio de C_T VF \geq 40 y valor medio de C_T WT < IL	Continúe en el paso 4.
Valor medio de C_T VF \geq 40 y valor medio de C_T WT \geq IL	La muestra no puede analizarse*.

* La concentración de ADN de la muestra no estaba dentro del intervalo aceptable o se ha omitido la matriz de ADN.

4. Calcule el valor de ΔC_T para todas las muestras válidas ($\Delta C_{T \text{ Muestra}}$) y los controles ($\Delta C_{T \text{ PC-VF}}$, $\Delta C_{T \text{ NC-VF}}$ y $\Delta C_{T \text{ COS}}$) conforme al esquema indicado a continuación.

$$\Delta C_T = \text{Valor medio de } C_T \text{ VF} - \text{Valor medio de } C_T \text{ WT}$$

5. Calcule el valor de $\Delta \Delta C_T$ para cada muestra desconocida ($\Delta \Delta C_{T \text{ Muestra}}$) y para cada control ($\Delta \Delta C_{T \text{ PC-VF}}$ y ($\Delta \Delta C_{T \text{ NC-VF}}$) conforme al esquema indicado a continuación.

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

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

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

6. Calcular la zona gris, o área de incertidumbre, en torno al valor COS-VF conforme al esquema indicado a continuación.

Nota: La zona gris (GZ, gray zone) de un análisis se define como un área de valores en los que el rendimiento discriminatorio no es suficientemente preciso. Un valor situado en la zona gris no permite determinar si el marcador de la diana está presente o ausente. La zona gris tiene que calcularse para cada experimento. En función de las variaciones observadas durante los estudios de precisión del ensayo (véase "Características del rendimiento", página 34), se ha definido la zona gris (GZ) como $\pm 7\%$ del valor $\Delta C_{T \text{ COS}}$.

Este cálculo es válido para todos los experimentos y en todos los instrumentos recomendados.

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

7. Determinar el genotipo de las muestras desconocidas utilizando la tabla 13.

En la tabla 14 se presenta un ejemplo de los cálculos y de la interpretación de los resultados para un experimento representativo.

Tabla 13. Interpretación de los resultados de genotipado.

Resultados	Interpretación
$\Delta\Delta C_{T \text{ Muestra}} > +\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07$	Se ha detectado la mutación V617F del gen JAK2.
$\Delta\Delta C_{T \text{ Muestra}} < -\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07$	No se ha detectado la mutación V617F del gen JAK2.
$\Delta\Delta C_{T \text{ Muestra}}$ dentro de la GZ $(-\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07 \leq \Delta\Delta C_{T \text{ Muestra}} \leq +\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07$	Resultado no concluyente.

Tabla 14. Ejemplo de los cálculos y de la interpretación de los resultados para un experimento representativo.

Muestra	C _T VF	Valor medio de C _T VF	C _T WT	Valor medio de C _T WT	ΔC _T	ΔΔC _T	Evaluación
PC	27,82		40,27				
PC	27,66	27,74	40,20	40,24	-12,50	20,12	Positivo
NC	41,23		26,66				
NC	40,96	41,10	26,85	26,76	14,34	-6,72	Negativo
COS	35,04		27,28				
COS	34,66	34,85	27,17	27,23	7,62	0	IL = 30,53 GZ: de -0,53 a +0,53
Muestra 1	42,15		28,86				
Muestra 1	41,10	41,63	28,73	28,80	12,83	-5,21	Negativo
Muestra 2	30,54		28,99				
Muestra 2	30,92	30,73	29,20	29,10	1,63	5,99	Positivo
Muestra 3	37,31		30,11				
Muestra 3	38,11	37,71	30,33	30,22	7,49	0,13	No concluyente (dentro de la GZ)
Muestra 4	45		39,25				
Muestra 4	45	45	38,45	38,85			No puede analizarse (valor medio de C _T VF > 40 y valor medio de C _T WT > IL)

Controles

El control de agua no debe dar un valor de C_T (o Cp) con el alelo V617F ni con el alelo nativo del gen JAK2. Un valor de C_T (Cp) para un control de agua puede indicar una contaminación cruzada. Véase “Guía de resolución de problemas”, más adelante.

El PC-VF debe interpretarse como una muestra en la que se ha detectado la mutación V617F del gen JAK2.

El NC-VF debe interpretarse como una muestra en la que no se ha detectado la mutación V617F del JAK2.

Véase “Guía de resolución de problemas”, más adelante, en relación con la interpretación de resultados inapropiados.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas le será de utilidad para resolver los problemas que puedan surgir. Para obtener más información, consulte también la página de preguntas frecuentes de nuestro Centro de Soporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del Servicio Técnico de QIAGEN estarán siempre encantados de responder a cualquier pregunta que pueda usted tener sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en el apartado “Información de contacto”, página 39).

Comentarios y sugerencias

La señal del control positivo es negativa

- | | |
|---|--|
| a) Error de pipeteo | Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.

Repetir la serie de PCR. |
| b) Almacenamiento incorrecto de los componentes del kit | Conservar el kit <i>ipsogen JAK2 MutaSearch</i> entre -30 °C y -15 °C y mantener la mezcla de primers y sonda (PPM) protegida de la luz. Consulte “Almacenamiento y manipulación de los reactivos”, página 12.

Evitar la congelación y descongelación repetidas.

Dividir los reactivos en partes alícuotas para su conservación. |

Comentarios y sugerencias

Los controles negativos dan positivo o los controles positivos dan negativo con la PPM errónea

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

Ausencia de señal, incluso en los controles positivos

a) Error de pipeteo u omisión de reactivos	Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Repetir la serie de PCR.
b) Efectos inhibidores del material de la muestra causados por una purificación insuficiente	Repetir la preparación del ADN.
c) LightCycler: Se ha seleccionado un canal de detección incorrecto	Fijar el ajuste del canal en F1/F2 o 530 nm/640 nm.
d) LightCycler: No se ha programado la adquisición de datos	Comprobar los programas del ciclo. Seleccionar el modo de adquisición "single" al final de cada segmento de hibridación del programa de PCR.

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

Baja calidad o baja concentración del ADN	Verificar siempre la calidad y la concentración del ADN antes de empezar.
---	---

Comentarios y sugerencias

LightCycler: Intensidad de fluorescencia demasiado baja

- a) Almacenamiento incorrecto de los componentes del kit Conservar el kit *ipsogen JAK2 MutaSearch* entre -30 °C y -15 °C y mantener la mezcla de primers y sonda (PPM) protegida de la luz. Consulte “Almacenamiento y manipulación de los reactivos”, página 12.
- Evitar la congelación y descongelación repetidas.
- Dividir los reactivos en partes alícuotas para su conservación.
- b) Cantidad inicial de ADN diana demasiado baja Aumentar la cantidad de ADN de la muestra.
- Nota:** Dependiendo del método seleccionado para la preparación del ADN pueden producirse efectos inhibidores.

LightCycler: La intensidad de la fluorescencia varía

- a) Error de pipeteo La variabilidad causada por el llamado “error de pipeteo” puede reducirse analizando los datos en el modo F1/F2 o 530 nm/640 nm.
- b) Centrifugación insuficiente de los capilares Es posible que la mezcla de PCR preparada siga en el extremo superior del capilar o que haya una burbuja de aire atrapada en la punta del capilar.
- Centrifugar siempre los capilares cargados con la mezcla de reacción según se describe en el manual de uso específico del aparato.
- c) Superficie externa de la punta del capilar sucia Utilizar siempre guantes cuando se manipulen los capilares.

Control de calidad

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

Limitaciones

Todos los reactivos pueden utilizarse exclusivamente para diagnóstico *in vitro*.

Este producto debe ser utilizado exclusivamente por personal con formación y preparación específicas en los procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

Para obtener resultados óptimos con la PCR es necesario un cumplimiento estricto del manual de usuario.

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

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

Características del rendimiento

Estudios no clínicos

Se realizaron estudios no clínicos para determinar el rendimiento analítico del kit *ipsogen* JAK2 MutaSearch.

Precisión cerca del límite de corte

Se midieron tres muestras independientes correspondientes a niveles bajos de mutación 38 veces utilizando 3 lotes del kit *ipsogen* JAK2 MutaSearch en el instrumento Applied Biosystems 7500. Los resultados se resumen en las tablas 15 y 16.

Tabla 15. Valores de ΔC_T y datos de precisión de los estudios no clínicos.

Muestra (% del alelo V617F)	ΔC_T [mínimo; máximo]	Coefficiente de variación (%)
0,5%	[7,8 ; 10,9]	7,2%
1%	[6,7 ; 8,8]	5,6%
2%	[5,9 ; 7,7]	5,5%
COS-VF	[6,9 ; 8,8]	6,2%

Tabla 16. Resultados del genotipado, según el cálculo de $\Delta\Delta C_T$, en estudios no clínicos.

Muestra (% del alelo V617F)	Duplicados	Mutación detectada	Resultado no concluyente	Mutación no detectada
0,5%	38	0	3	35
1%	38	3	27	4
2%	38	33	5	0

La mutación no se detectó en el 92% de las muestras con un 0,5% del alelo V617F del gen JAK2.

La mutación se detectó en el 87% de las muestras con un 2% del alelo V617F del gen JAK2.

Límites de cantidad de muestra

La cantidad de muestra de ADN genómico recomendada es de 25 ng. Se analizaron diferentes cantidades de ADN de muestra para determinar si la cantidad de ADN genómico podría afectar a los resultados de interpretación de las muestras. Los resultados se resumen en la tabla 17.

Tabla 17. Efecto de la cantidad de ADN genómico de la muestra.

Muestra (% del alelo V617F)	Cantidad de muestra (ng)	Duplicados	Mutación detectada	Resultado no concluyente	Mutación no detectada
<1%	2.5	6	Muestras no analizadas (valores > IL)		
	10	6	0	1	5
	25	6	0	0	6
	100	6	0	0	6
	250	6	0	0	6
Total < 1%		30	0	1	23
1%	2.5	3	Muestras no analizadas (valores > IL)		
	10	3	0	1	2
	25	3	0	2	1
	100	3	0	3	0
	250	3	0	2	1
Total 1%		15	0	8	4
2%, 4%, 50%, 78% o 100%	2.5	15	15	0	0
	10	15	15	0	0
	25	15	15	0	0
	100	15	15	0	0
	250	15	15	0	0
Total 2%, 4%, 50%, 78%, 100%		75	75	0	0

El análisis de muestras diluidas o muy concentradas (es decir, con < 5 ng/μl de ADN o > 5 ng/μl de ADN, respectivamente) estableció que dichas

concentraciones podrían afectar a los valores de $\Delta\Delta C_T$ (o $\Delta\Delta C_p$). Esto podría no dar resultados positivos falsos o negativos falsos, sino únicamente resultados no concluyentes con porcentajes muy bajos del alelo V617F del gen JAK2.

Estudios clínicos

Se analizaron muestras de ADN (extraídas de sangre o de médula ósea) de 81 sujetos, que presentaban posible neoplasia mieloproliferativa y que habían sido caracterizados previamente con el kit *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ* (QIAGEN, n.º de referencia 673223), junto con 9 muestras de ADN de donantes sanos utilizando el kit *ipsogen JAK2 MutaSearch* con el instrumento Applied Biosystems 7500. Los resultados se resumen en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados de las muestras analizadas con el kit *ipsogen JAK2 MutaSearch* y con el kit *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ*.

		Kit <i>ipsogen JAK2 MutaSearch EZ</i>		
		Mutación detectada	No concluyente	Mutación no detectada
Kit <i>ipsogen JAK2 MutaSearch</i>	Muestras			
	Mutación detectada	37	1	1
	No concluyente	0	0	1
	Mutación no detectada	0	0	50

La concordancia global fue del 98,9% (intervalo de confianza del 95%: 93,8-99,8%).

La concordancia positiva fue del 100,0% (intervalo de confianza del 95%: 90,6-100,0%).

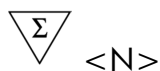
La concordancia negativa fue del 98,0% (intervalo de confianza del 95%: 89,7-99,7%).

Referencias bibliográficas

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

Símbolos

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



Contiene reactivos suficientes para <N> reacciones



Fecha de caducidad



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*



Número de referencia



Número de lote



Número de material



Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar instrucciones de uso

Información de contacto

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

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de referencia
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit (24)	Para 24 reacciones: control positivo de V617F, control negativo de V617F, muestra discriminadora de V617F, mezcla de primers y sonda para el alelo nativo del gen JAK2, mezcla de primers y sonda para el alelo V617F del gen JAK2	673823
Rotor-Gene Q MDx: para análisis de PCR en tiempo real validado para diagnóstico <i>in vitro</i> en aplicaciones clínicas		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no se incluye la instalación y la formación	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033
Kit QIAamp® DNA Blood Maxi: para purificación de ADN genómico a partir de sangre		
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (10)	Para 10 preparaciones "maxi" de ADN: 10 columnas QIAamp Maxi Spin, proteasa de QIAGEN, tampones y tubos de recogida (50 ml)	51192
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (50)	Para 50 preparaciones "maxi" de ADN: 50 columnas QIAamp Maxi Spin, proteasa de QIAGEN, tampones y tubos de recogida (50 ml)	51194

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

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

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

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

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

La compra de este producto no confiere ningún derecho de empleo en ensayos clínicos de fármacos dirigidos a JAK2 V617F. QIAGEN desarrolla programas de licencia específicos para tales usos. Póngase en contacto con nuestro departamento jurídico en la dirección de correo electrónico jak2licenses@qiagen.com.

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

Acuerdo de licencia limitada

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

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

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

HB-1354-004 © 2013–2016 QIAGEN, reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

