

Junio de 2016

Manual del kit *ipsogen*[®] JAK2 MutaScreen



10 (n.º de referencia 673022)



24 (n.º de referencia 673023)

Versión 1

IVD

Diagnóstico in vitro cuantitativo

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



REF

673022, 673023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALEMANIA

R3

MAT

1072500ES



Sample & Assay Technologies

QIAGEN: tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular

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 define los estándares 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 obtener más información, visite **www.qiagen.com**.

Contenido

Uso previsto	4
Resumen y explicación	4
Principio del procedimiento	6
Materiales suministrados	8
Contenido del kit	8
Materiales requeridos pero no suministrados	9
Advertencias y precauciones	10
Precauciones generales	10
Almacenamiento y manipulación de reactivos	11
Procedimiento	12
Preparación del ADN de la muestra	12
Almacenamiento de ácidos nucleicos	12
Protocolos	
■ qPCR en equipos Rotor Gene Q con rotor de 72 tubos	13
■ qPCR en equipos Applied Biosystems y ABI PRISM	24
■ qPCR en el equipo LightCycler 480	34
■ qPCR en el equipo LightCycler 2.0	43
Interpretación de los resultados	49
Representación gráfica y criterios de control de calidad	49
Cálculo del cociente FAM/VIC normalizado y genotipado	50
Guía de resolución de problemas	53
Control de calidad	55
Limitaciones	55
Características de rendimiento	56
Estudios no clínicos	56
Estudios clínicos	57
Referencias	63
Símbolos	64
Información de contacto	64
Información para pedidos	65

Uso previsto

Los kits *ipsogen* JAK2 MutaScreen están diseñados 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 codones 615 a 619 (1) el ensayo puede dar resultados negativos falsos.

Nota: el kit debe utilizarse de acuerdo con las instrucciones recogidas en este manual, junto con reactivos y equipos validados. Cualquier uso no autorizado de este producto o modificación de los componentes eximirá a QIAGEN de posibles responsabilidades.

Resumen y explicación

En 2005 se identificó la mutación somática recurrente V617F, que afecta al gen Janus tirosinquinasa 2 (JAK2) (2-5), lo que constituyó un gran avance en la comprensión, la clasificación y el diagnóstico de las neoplasias mieloproliferativas (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, mastocitosis sistémica y leucemia neutrófila crónica, pero en el 0% de LMC (6).

La mutación corresponde al cambio de un solo nucleótido en la posición 1849 del gen JAK2 en el exón 14, lo que provoca la sustitución aislada de una valina (V) por una fenilamina (F) en la posición 617 de la proteína (dominio JH2). Esto 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 (7). 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 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 8)

Criterios para el diagnóstico de policitemia vera (PV)	
Principales	1. Hemoglobina (Hgb) $>18,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (hombres) o $>16,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (mujeres), o Hgb o hematocrito (Hct) > 99 del rango de referencia para edad, sexo o altitud de la residencia, o Hgb $>17 \text{ g.dl}^{-1}$ (hombres) o $>15 \text{ g.dl}^{-1}$ (mujeres) si se asocia con un incremento sostenido de $\geq 2 \text{ g.dl}^{-1}$ 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 <i>JAK2V617F</i> o una mutación similar
Secundarios	1. Mieloproliferación trilineal en médula ósea 2. Nivel sérico de eritropoyetina anómalo 3. Formación endógena de colonias eritroides (ECC)
Criterios para el diagnóstico de trombocitopenia esencial (TE)	
Principales	1. Recuento de plaquetas $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ 2. Proliferación megacariocítica con morfología grande y madura Escasa o inexistente proliferación granulocítica o eritrocítica 3. Incumplimiento de los criterios de la OMS para leucemia mieloide crónica (LMC), PV, mielofibrosis primaria (MFP), síndrome mielodisplásico (SMD) u otras neoplasias mieloides 4. Manifestación de <i>JAK2V617F</i> u otros marcadores clónicos, o Ausencia de indicios de trombocitosis reactiva
Secundarios	-
Criterios para el diagnóstico de mielofibrosis primaria (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 <i>JAK2V617F</i> u otros marcadores clónicos, o Carencia de indicios de fibrosis reactiva en la médula ósea
Secundarios	1. Leucoeritroblastosis 2. Aumento del nivel sérico de deshidrogenasa láctica (DHL) 3. Anemia 4. Esplenomegalia palpable

Recientemente, expertos internacionales han propuesto criterios para la realización de ensayos terapéuticos de PV y TE. A partir de datos sobre aloinjertos, el interferón alfa o la hidroxiurea, se ha incorporado la cuantificación de la mutación JAK2V617F como una herramienta que podría resultar práctica para la monitorización de la respuesta al tratamiento (9). Se ha observado una disminución de la carga de JAK2 V617F como respuesta a algunos de los nuevos fármacos anti-JAK2 específicos en fase de desarrollo clínico (10).

Principio del procedimiento

En un ensayo de discriminación alélica se utilizan dos sondas TaqMan® en un ensayo multiplexado. Una es perfectamente complementaria de la secuencia del alelo 2 (por ejemplo, el alelo nativo) y la otra lo es del alelo 1 (por ejemplo, el alelo con una mutación). Cada sonda está marcada con un fluoróforo característico en su extremo 5' (indicador), como FAM™ or VIC®, y contiene un supresor no fluorescente en el extremo 3'. Las sondas contienen también un ligando de unión al surco menor (MGB™) que permite el uso de sondas más cortas con una mayor estabilidad y, por tanto, una discriminación alélica más precisa.

Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda perfectamente emparejada se escinde por la actividad 5'→3' exonucleasa de la polimerasa Taq ADN, proceso que separa el fluoróforo indicador del supresor de la señal y, por tanto, libera fluorescencia detectable. La sonda que no esté perfectamente emparejada será desplazada, no escindida, por la polimerasa Taq ADN y, por lo tanto, no se liberará fluorescencia. La señal fluorescente (VIC o FAM) generada se recoge al final de la PCR (fase final) e indica inmediatamente la presencia de las secuencias diana en la muestra (el alelo nativo, el alelo mutado o ambos) sin necesidad de etapas largas y laboriosas de procesamiento tras la PCR, que también aumentan el riesgo de contaminación. No se determina la cantidad real de la secuencia diana.

El kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen utiliza esta tecnología como se muestra en la ilustración (ilustración 1).

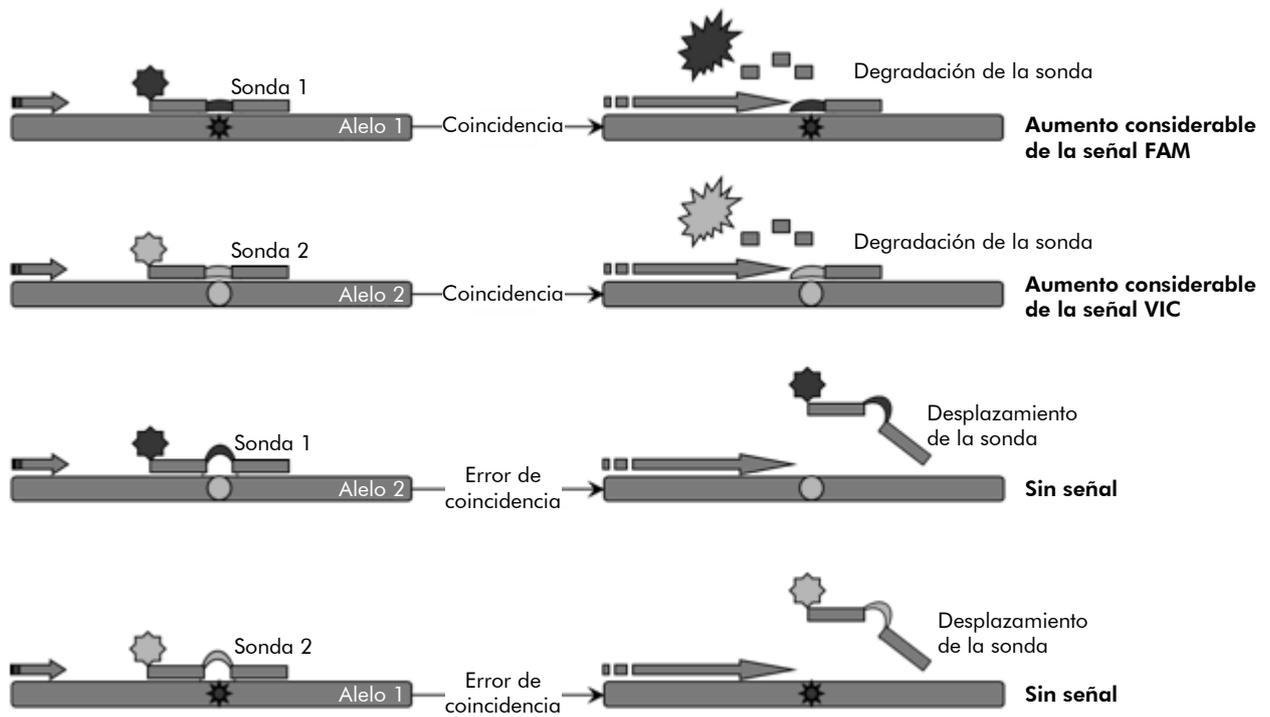


Ilustración 1. Ensayo multiplexado con sonda TaqMan. El kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen utiliza esta tecnología para la discriminación alélica.

Materiales suministrados

Contenido del kit

Kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen		(10)	(24)
N.º de referencia		673022	673023
Número de reacciones		24	10
V617F Positive Control* (control positivo V617F)	PC-VF	30 µl	30 µl
V617F Negative Control† (control negativo V617F)	NC-VF	30 µl	30 µl
Cut-Off Sample (muestra discriminatoria)	COS-VF	30 µl	30 µl
Primers and probes mix JAK2 V617F‡ (mezcla de primers y sondas JAK2 V617F)	PPM-VF 10x	70 µl	145 µl
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit Handbook (manual de uso en inglés)		1	1

* Control positivo: 100% ADN V617F.

† Control negativo: 100% ADN nativo; 0% V617F.

‡ Mezcla de primers inversos y directos específicos para el gen JAK2, sonda FAM específica para la mutación V617F y sonda VIC para ADN nativo.

Nota: centrifugue los tubos brevemente antes de usarlos.

Nota: para analizar muestras desconocidas con el kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen es necesario extraer ADN genómico. Los reactivos necesarios para realizar la extracción de ADN (p. ej., QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit, n.º de referencia 1304) no se suministran y deben ser validados para su funcionamiento con el kit.

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.

Reactivos

- Agua exenta de nucleasas de calidad PCR
- Tampón TE exento de nucleasas 1x, pH 8,0 (p. ej., Thermo Fisher Scientific Inc., n.º de referencia 12090015)
- Tampón y polimerasa Taq ADN: Los reactivos validados son TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., n.º de referencia 4304437) y LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, n.º de referencia 04535286001)
- Reactivos para gel agarosa 0,8-1% en 0,5x de tampón de electroforesis TBE

Consumibles

- Puntas de pipeta para PCR estériles, libres de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros hidrófobos
- Tubos para PCR exentos de DNasa y RNasa de 0,5 ml o 0,2 ml
- Hielo

Equipo

- Pipetas específicas para PCR (1-10 μ l; 10-100 μ l; 100-1000 μ l)
- Centrífuga de mesa* con rotor para tubos de reacción de 0,2 ml/0,5 ml (capaz de alcanzar 10.000 rpm)
- Espectrofotómetro* para cuantificación de ADN
- Equipo para PCR en tiempo real:* Rotor-Gene Q 5plex HRM u otro equipo Rotor-Gene; LightCycler 2.0 o 480; Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS o ABI PRISM 7900HT SDS y el material específico asociado.
- Equipo* para electroforesis en gel de campo pulsado

* 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.

Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los requisitos de seguridad local.

Precauciones generales

Las pruebas de Q-PCR exigen la adopción de buenas prácticas de laboratorio que cumplan los reglamentos vigentes y las normas aplicables, específicas para laboratorios de biología molecular, entre ellas el buen mantenimiento del equipo.

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 dilución excesiva de los reactivos o un cambio en los tiempos y las temperaturas de incubación pueden causar resultados erróneos o dispares. El reactivo PPM-VF puede alterarse si se expone a la luz. Todos los reactivos están formulados de manera específica para su utilización en este análisis. Se recomienda no sustituir ningún componente para garantizar un rendimiento óptimo del ensayo.

Tenga la máxima precaución para evitar:

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

Por lo tanto, se recomienda 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). Añadir los moldes de

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

Almacenamiento y manipulación de reactivos

Los kits se envían en hielo seco, pero deben conservarse entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ tras su recepción.

- Minimice la exposición a la luz de las mezclas de primers y sondas (tubo PPM-VF).
- Mezcle suavemente los tubos y centrifúgelos 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. Si se almacena adecuadamente, el producto conserva las características de rendimiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

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 la muestra

El ADN genómico debe proceder de sangre completa, de linfocitos de sangre periférica purificados, de polimorfonucleares o de granulocitos. Para permitir la comparación de resultados, se recomienda utilizar la misma fracción celular y el mismo método de extracción de 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 electroforesis en gel.

El cociente A_{260}/A_{280} debería ser de 1,7 a 1,9. Los cocientes inferiores normalmente indican que existe contaminación causada por productos químicos proteínicos u orgánicos. El análisis electroforético en gel de agarosa del 0,8% al 1% permitirá visualizar el ADN aislado como una banda nítida de unos 20 kb. Una ligera mancha es aceptable.

El ADN resultante se diluye a 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 (hasta 24 horas), se recomienda almacenar los ácidos nucleicos a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C. Para el almacenamiento a largo plazo (más de 24 horas), recomendamos almacenar a una temperatura de -20 °C.

Protocolo: qPCR en equipos Rotor Gene Q con rotor de 72 tubos

Al utilizar este equipo, se recomienda realizar todas las mediciones por duplicado, tal como se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Número de reacciones de los equipos Rotor Gene Q MDx 5plex HRM o Rotor Gene Q 5plex HRM con rotor de 72 tubos

Muestras	Reacciones
Mezcla de primers y sondas JAK2 V617F (PPM-VF) (56 reacciones)	
24 muestras de ADN	24 x 2 reacciones
3 controles de ADN	3 x 2 reacciones (PC-VF, NC-VF, y COS-VF, cada una analizada por duplicado)
Control de agua	2 reacciones

2. **Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente todos los tubos (aproximadamente 10 s a 10.000 rpm) para recoger el líquido en el fondo del tubo.**
3. **Prepare 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 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. Se puede preparar un premezcla, según el número de reacciones, con la misma mezcla de primer y sonda. Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

En los equipos Rotor-Gene, el kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen se puede utilizar para analizar 24 muestras por duplicado en 1 experimento (ilustración 2), 20 muestras por duplicado en 2 experimentos o 15 muestras por duplicado en 3 experimentos.

Tabla 3. Preparación de la mezcla de qPCR

Componente	Número de reacciones (μ l)				Concentración final
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Mezcla de primers y sondas, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Agua exenta de nucleasas de calidad PCR	5	285	145	95	–
Muestra (añadir en el paso 5)	5	5 en cada una	5 en cada una	5 en cada una	–
Volumen total	25	25 en cada una	25 en cada una	25 en cada una	–

* 24 muestras; 1 experimento/kit

† 10 muestras; 2 experimentos/kit

‡ 5 muestras; 3 experimentos/kit

4. Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente la mezcla de qPCR (aproximadamente 10 s a 10.000 rpm) para recoger el líquido en el fondo del tubo.
5. Dispense 20 μ l de la premezcla de qPCR por tubo.
6. Agregue 5 μ l del material de ADN de muestra o de controles en el tubo correspondiente (volumen total: 25 μ l).
7. Mezcle suavemente pipeteando arriba y abajo.
8. Cierre los tubos de PCR. Coloque los tubos en el rotor de 72 tubos según las recomendaciones del fabricante. Coloque tubos vacíos en todas las demás posiciones.
9. Asegúrese de que el anillo de fijación (accesorio del equipo Rotor-Gene) se encuentra en la parte superior del rotor para evitar la apertura accidental de los tubos durante el análisis. Coloque el rotor en el equipo Rotor-Gene Q según las recomendaciones del fabricante.
10. Para la detección de ADN de JAK2, cree un perfil de temperatura a partir de los pasos siguientes.

Configuración de los parámetros generales del ensayo	Ilustraciones 3 y 4
Amplificación del ADN	Ilustración 5
Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia	Ilustración 6

Si desea obtener más información sobre cómo programar equipos Rotor-Gene, consulte el manual de usuario del equipo. En las ilustraciones, los parámetros de configuración del software aparecen resaltados dentro de un cuadro en negrita. Las ilustraciones incluidas están destinadas a los equipos Rotor-Gene Q.

11. Inicie el software Rotor-Gene. En el cuadro de diálogo "New Run" (Nueva serie), haga clic en "New" (Nueva).

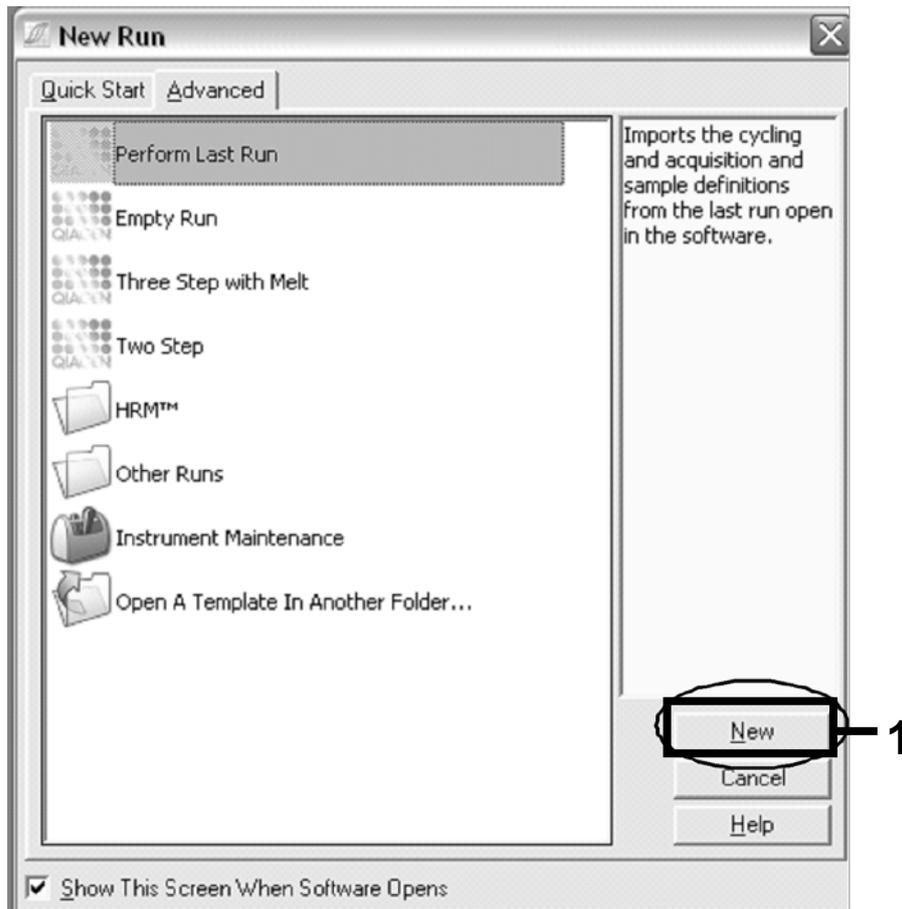


Ilustración 3. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas).

12. En el cuadro de diálogo “New Run Wizard” (Asistente para series nuevas) ajuste el volumen de la reacción a 25 μ l y pulse “Next” (Siguiete).

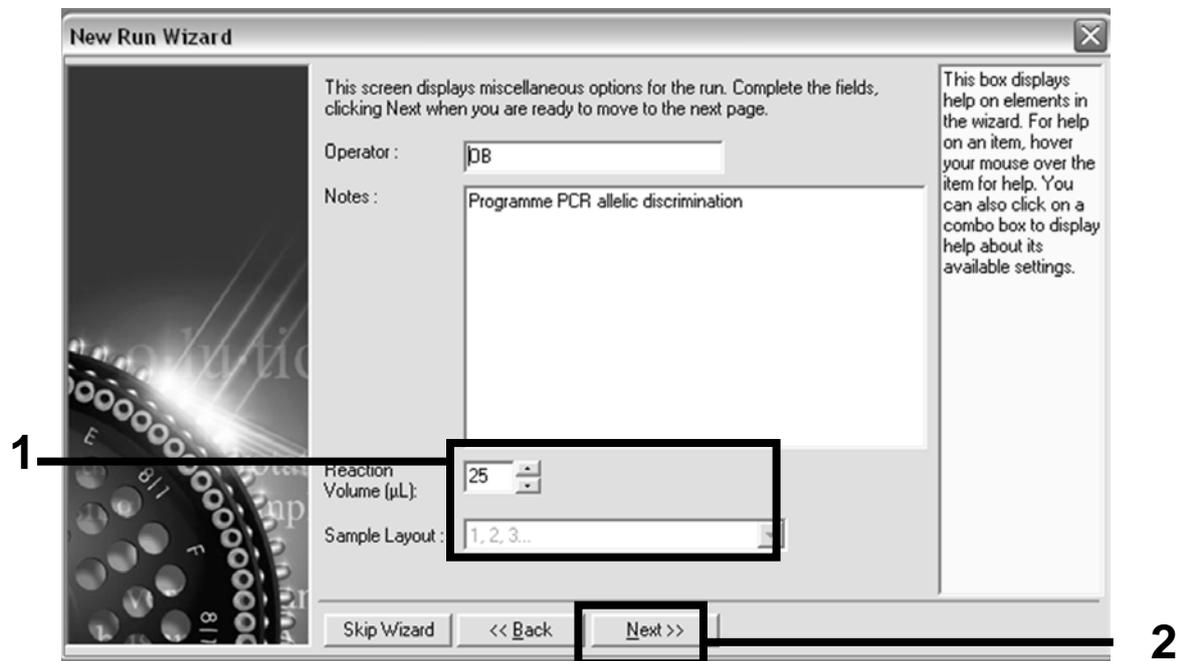


Ilustración 4. Configuración de los parámetros generales del ensayo.

13. Haga clic en el botón “Edit Profile” (Editar perfil) situado en el siguiente cuadro de diálogo “New Run Wizard” (Asistente para series nuevas) y programe el perfil de temperatura tal como se muestra en la tabla 4 y la ilustración 5. Asegúrese de añadir el último paso de adquisición a 60 °C, en cada ciclo, para ambos canales: “Green” (Verde) (FAM) y “Yellow” (Amarillo) (VIC).

Tabla 4. Perfil de temperatura

“Hold” (Pausa)	Temperatura: 50 °C Tiempo: 2 min
“Hold 2” (Pausa 2)	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 min
“Cycling” (Ciclado)	50 repeticiones 92° durante 15 s 60° durante 1 min; modo de adquisición único (single) Adquisición de fluorescencia FAM en el canal verde de ciclado A Adquisición de fluorescencia VIC en el canal amarillo de ciclado A

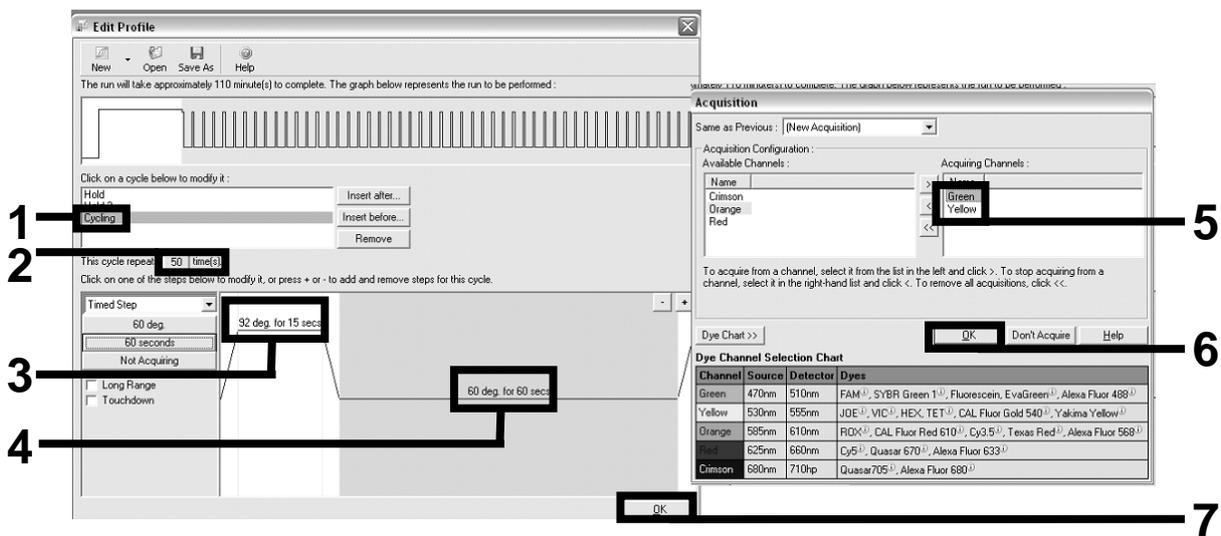


Ilustración 5. Amplificación del ADN.

14. El rango de detección de los canales de fluorescencia se debe determinar según las intensidades de fluorescencia de los tubos de PCR. Haga clic en "Gain Optimisation" (Optimización de ganancia) en el cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) para abrir el cuadro de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuración de la optimización de ganancia automática). Haga clic en "Optimise Acquiring" (Adquirir optimización) (ilustración 6) y, a continuación, en "OK" (Aceptar) en los cuadros de diálogo "Auto-Gain Optimisation Channel Settings" (Configuración del canal de optimización de ganancia automática) de cada canal ("Green" [Verde] y "Yellow" [Amarillo], ilustración 6). Asegúrese de que la casilla "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Ejecutar la optimización antes de la primera adquisición) está marcado para cada canal (ilustración 6).

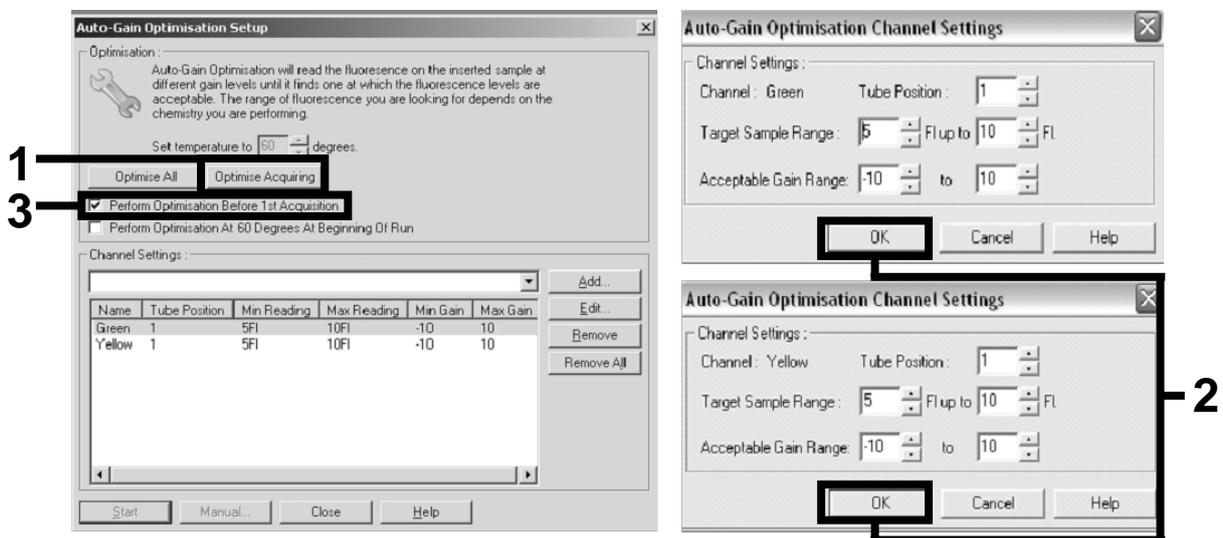


Ilustración 6. Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia.

15. Los valores de ganancia determinados por la calibración del canal se guardan automáticamente y se enumeran en la última ventana de menú del procedimiento de programación. Haga clic en "Start Run" (Iniciar la serie) para iniciar el programa.

16. Introduzca la configuración del rotor en el software Rotor-Gene (ilustración 7).

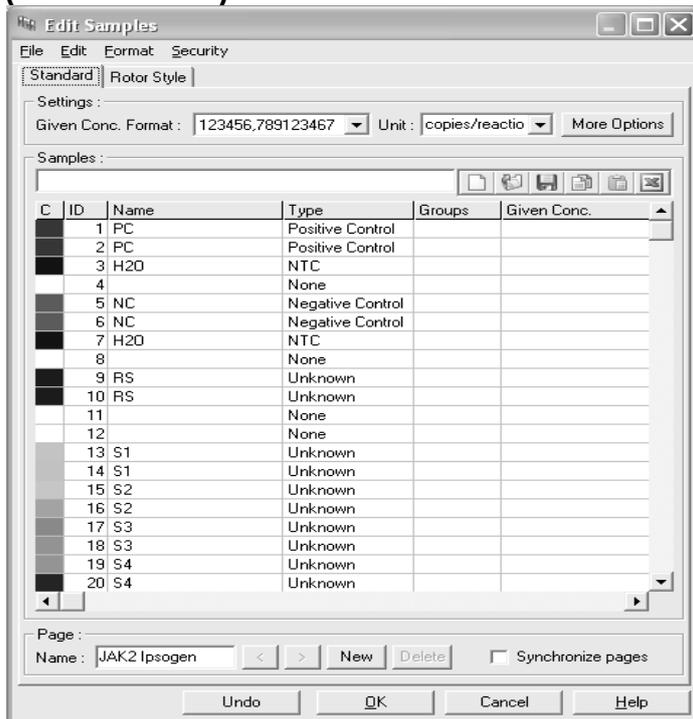


Ilustración 7. Configuración de Rotor-Gene: "Edit Samples" (Editar muestras).

Procedimiento de análisis de fase final para la configuración del equipo Rotor-Gene Q 5plex HRM

17. Una vez finalizado el programa de PCR, haga clic en "Analysis" (Análisis) en la barra de herramientas (ilustración 8).



Ilustración 8. "Analysis" (Análisis).

Protocolo: qPCR en equipos Applied Biosystems y ABI PRISM

Al utilizar un equipo de qPCR con placa de 96 pocillos, se recomienda realizar todas las mediciones por duplicado, tal como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Número de reacciones para equipos Applied Biosystems 7300 y 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 o ABI PRISM 7900HT

Muestras	Reacciones
Mezcla de primers y sondas JAK2 V617F (PPM-VF) (56 reacciones)	
24 muestras de ADN	24 x 2 reacciones
3 controles de ADN	3 x 2 reacciones (PC-VF, NC-VF, y COS-VF, cada una analizada por duplicado)
Control de agua	2 reacciones

Procesamiento de muestras en equipos Applied Biosystems 7300 y 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 o ABI PRISM 7900HT

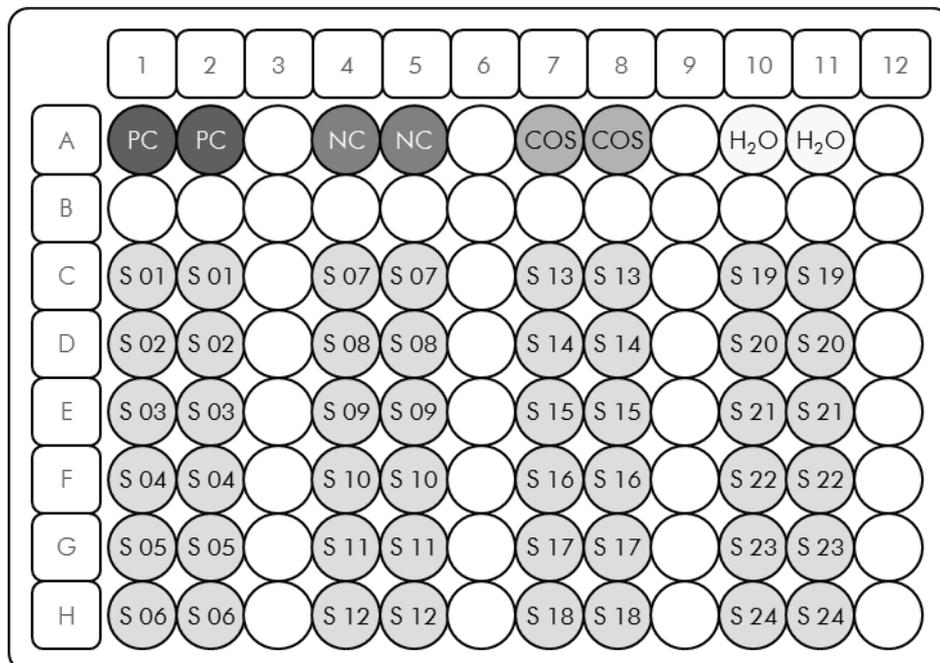


Ilustración 12. Sugerencia de configuración de la placa para un experimento con el kit ipsogen JAK2 MutaScreen. PC: control positivo; NC: control negativo; COS: muestra discriminadora; S: muestra de ADN; H₂O: control de agua.

qPCR en equipos Applied Biosystems 7300 y 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 o ABI PRISM 7900HT

Nota: coloque los componentes en hielo en todos los pasos.

Procedimiento

- 1. Descongele todos los componentes necesarios y colóquelos en hielo.**
Los componentes deben retirarse del congelador aproximadamente 10 min antes de comenzar el procedimiento.
- 2. Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente todos los tubos (aproximadamente 10 s a 10.000 rpm) para recoger el líquido en el fondo del tubo.**
- 3. Prepare 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. Se puede preparar un premezcla, según el número de reacciones, con la misma mezcla de primer y sonda. Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

En los equipos Applied Biosystems 7300 y 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 o ABI PRISM 7900HT, el kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen se puede utilizar para análisis de 24 muestras por duplicado en 1 experimento (ilustración 12), 20 muestras por duplicado en 2 experimentos o 15 muestras por duplicado en 3 experimentos.

Tabla 6. Preparación de la mezcla de qPCR

Componente	Número de reacciones (μ l)				Concentración final
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Mezcla de primers y sondas, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Agua exenta de nucleasas de calidad PCR	5	285	145	95	–
Muestra (añadir en el paso 4)	5	5 en cada una	5 en cada una	5 en cada una	–
Volumen total	25	25 en cada una	25 en cada una	25 en cada una	–

* 24 muestras; 1 experimento/kit

† 10 muestras; 2 experimentos/kit

‡ 5 muestras; 3 experimentos/kit

4. **Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente la mezcla de qPCR (aproximadamente 10 s a 10.000 rpm) para recoger el líquido en el fondo del tubo.**
5. **Dispense 20 μ l de la premezcla de qPCR por pocillo.**
6. **Agregue 5 μ l del material de ADN de muestra o de controles en el pocillo correspondiente (volumen total: 25 μ l).**
7. **Mezcle suavemente pipeteando arriba y abajo.**
8. **Cierre la placa y centrifugue brevemente (300 x g, aproximadamente 10 s).**
9. **Coloque la placa en el termociclador según las recomendaciones del fabricante.**
10. **Programe el termociclador con el programa de ciclado térmico tal como se indica en la tabla 7 e inicie el análisis.**

Tabla 7. Perfil de temperatura para equipos Applied Biosystems y ABI PRISM

“Hold” (Pausa)	Temperatura: 50 °C Tiempo: 2 min
“Hold 2” (Pausa 2)	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 min
“Cycling” (Ciclado)	50 repeticiones 92 °C durante 15 s 60 °C durante 1 min

Análisis del procesamiento poslectura para equipos Applied Biosystems y ABI PRISM

Si desea obtener información detallada sobre la programación de equipos Applied Biosystems 7300 y 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700, o ABI PRISM 7900HT, consulte la guía de usuario del equipo. Para obtener una mejor visión general, los parámetros de configuración del software aparecen resaltados dentro de un cuadro en negrita.

- 11. Una vez finalizado el ensayo, seleccione “Start/Program” (Inicio/Programa) y, a continuación, “File/New” (Archivo/Nuevo).**
- 12. En el cuadro de diálogo “New Document Wizard” (Asistente para documentos nuevos), haga clic en la lista desplegable “Assay” (Ensayo) y seleccione “Allelic Discrimination” (Discriminación alélica) (ilustración 13).**

13. Acepte la configuración predeterminada para los campos “Container” (Contenedor) y “Template” (Molde) (“96-Well Clear” (Placa vacía de 96 pocillos) y “Blank Document” (Documento en blanco), ilustración 13). En el campo “Plate Name” (Nombre de placa), introduzca *AD Post-read* (poslectura) (ilustración 13) y, a continuación, “Next>” (Siguiete) para acceder al cuadro de diálogo “Select Markers” (Seleccionar marcadores).

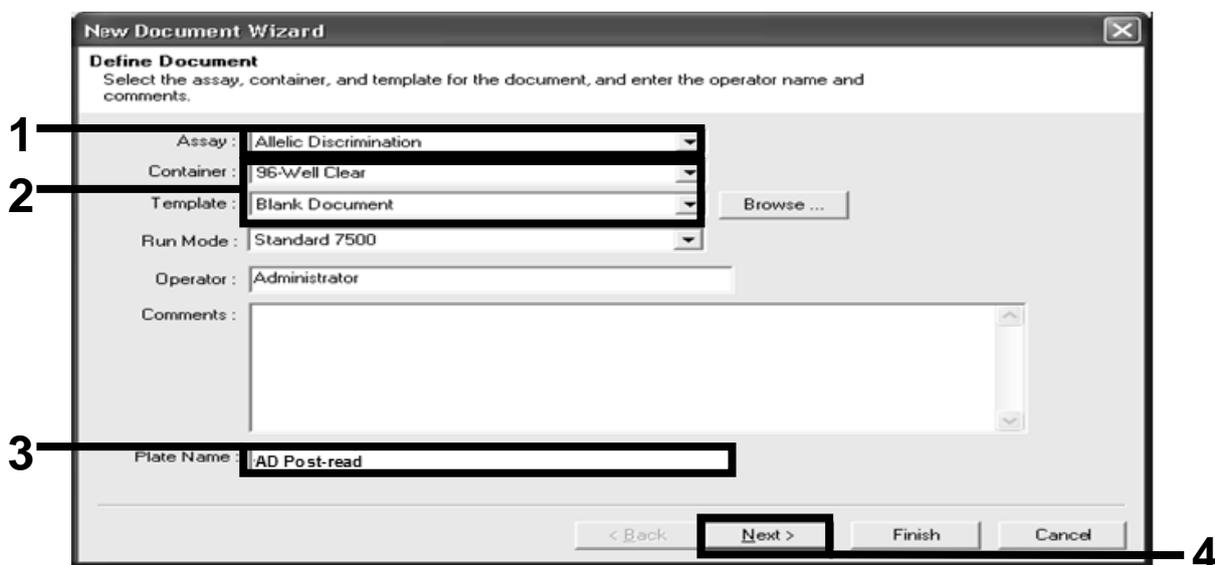


Ilustración 13. Configuración predeterminada para crear un nuevo procesamiento poslectura (“New Document Wizard” [asistente para documentos nuevos]).

14. Si el panel “Markers in Document” (Marcadores del documento) del cuadro de diálogo “Select Markers” (Seleccionar marcadores) contiene un marcador adecuado para la aplicación, continúe con el paso 18. En caso contrario, continúe con el paso 15.

15. Para crear detectores y marcadores, proceda como se indica a continuación. Haga clic en “New Detector” (Nuevo detector) (ilustración 14).

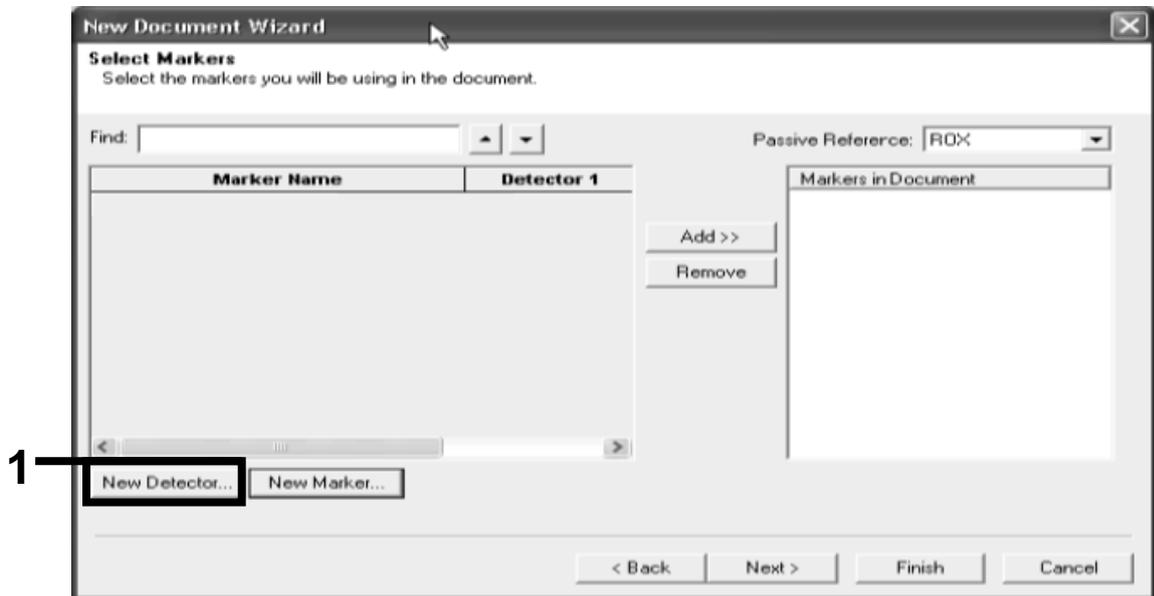


Ilustración 14. El panel “Markers in Document” (Marcadores del documento) no contiene un marcador adecuado para la aplicación.

16. En el cuadro de diálogo “New Detector” (Nuevo detector), introduzca **Allele A** (alelo A) en el campo “Name” (Nombre) (ilustración 15). Deje la configuración de “Reporter Dye” (Fluoróforo indicador) en “FAM”. Haga clic en el botón “Color” (Color), seleccione un color y, a continuación, pulse “OK” (Aceptar) (ilustración 15). Haga clic en “Create Another” (Crear otro) (ilustración 15).

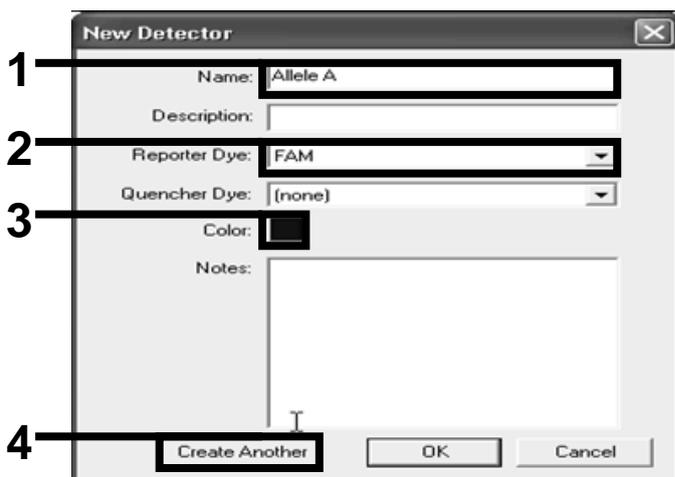


Ilustración 15. Creación de detectores.

17. En el siguiente cuadro de diálogo "New Detector" (Nuevo detector), introduzca *Allele B* (alelo B) en el campo "Name" (Nombre). Seleccione "VIC" en el campo "Reporter Dye" (Fluoróforo indicador). Haga clic en el botón "Color" (Color), seleccione un color y, a continuación, haga clic en "OK" (Aceptar).
18. Haga clic en "New Marker" (Nuevo marcador) en el cuadro de diálogo "Select Markers" (Seleccionar marcadores) (consulte la ilustración 14).
19. En el cuadro de diálogo "New Marker" (Nuevo marcador), introduzca *JAK* en el campo "New Marker Name" (Nombre del nuevo marcador) (ilustración 16). Seleccione los detectores "Allele A" (Alelo A) y "Allele B" (Alelo B) creados en los pasos 16 y 17 (o ya definidos) y haga clic en "OK" (Aceptar) (ilustración 16).

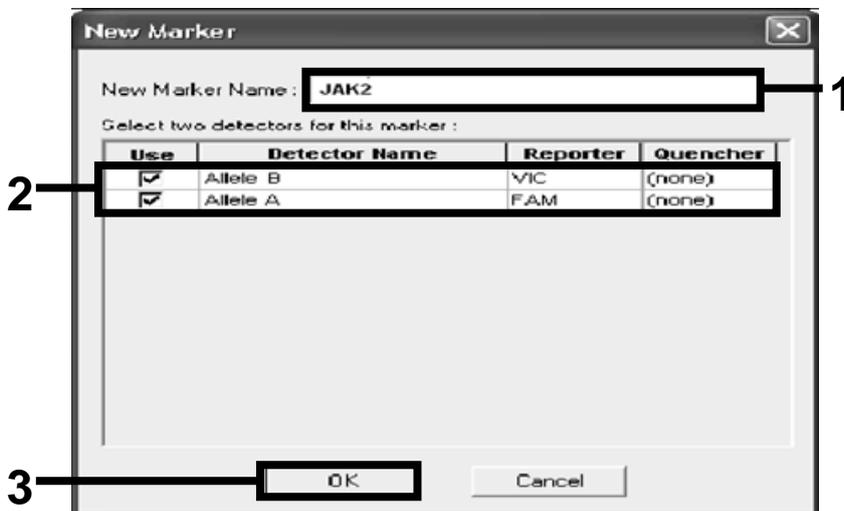


Ilustración 16. Creación de marcadores.

20. En el cuadro de diálogo "Select Markers" (Seleccionar marcadores), seleccione el marcador "JAK2" creado anteriormente o bien un marcador predefinido adecuado y, a continuación, haga clic en "Add>>" (Añadir>>) (ilustración 17).

Nota: para quitar un marcador, selecciónelo y haga clic en "Remove" (Eliminar).

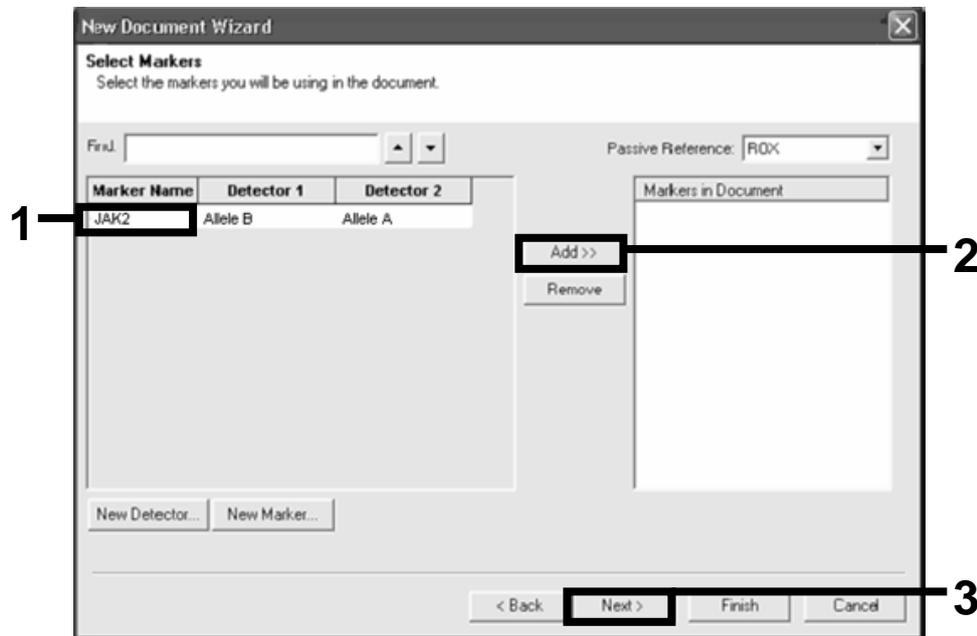


Ilustración 17. Selección de marcadores.

21. Haga clic en "Next>" (Siguiente>).

22. En el cuadro de diálogo "Setup Sample Plate" (Configurar placa de muestras), haga clic y arrastre para seleccionar el marcador de los pocillos que contienen muestras. Haga clic en "Finish" (Finalizar).

23. Seleccione la pestaña "Instrument" (Equipo) y cambie el volumen de la muestra a 25 µl.

24. Seleccione "File/Save" (Archivo/guardar) y, a continuación, haga clic en "Save" (Guardar) para conservar el nombre que asignó al crear la placa.

25. Cargue la placa de reacción en el equipo según las recomendaciones del fabricante.

26. Inicie el procesamiento poslectura. Haga clic en “Post-Read” (Poslectura).

El equipo realizará un ensayo de 1 ciclo durante 60 segundos a 60 °C. Durante el ensayo, el equipo recoge las fluorescencias FAM y VIC de cada pocillo (ilustración 18).

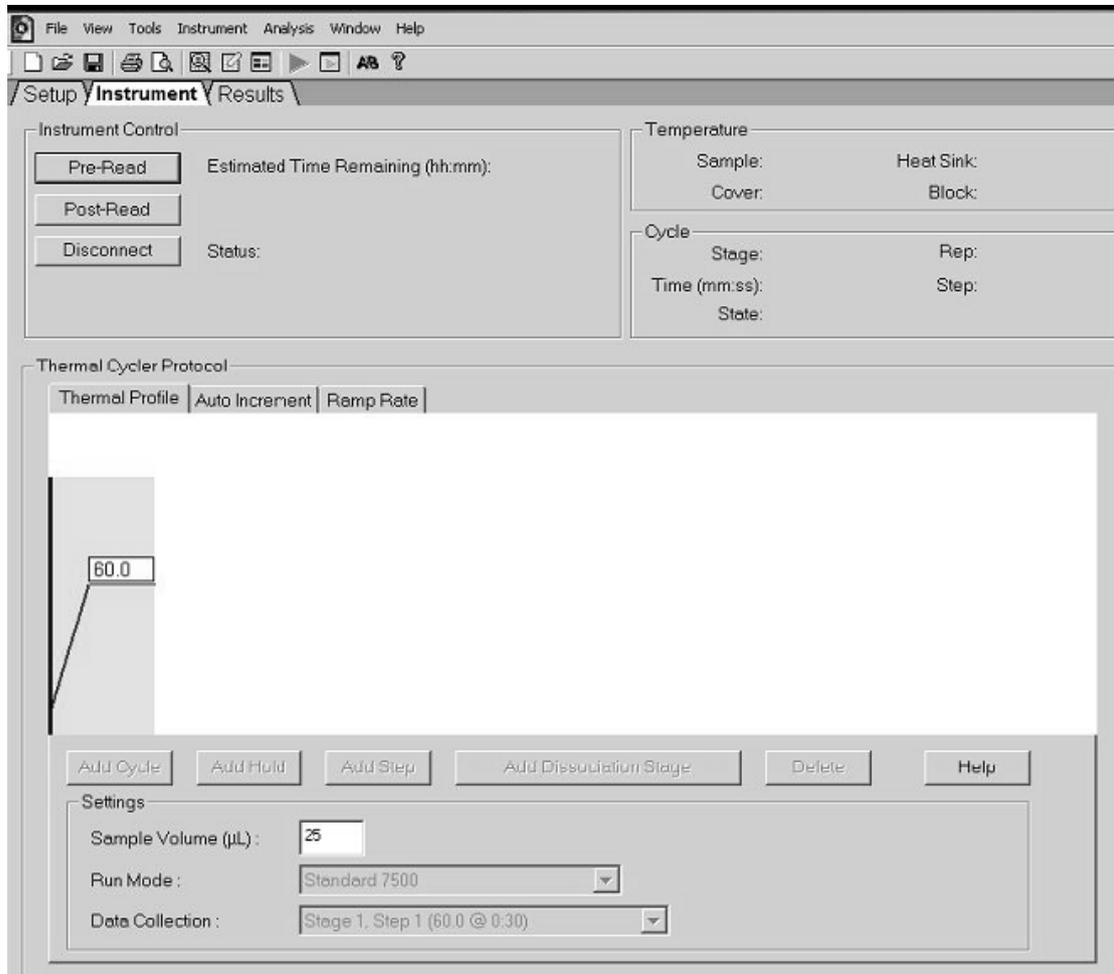


Ilustración 18. Procesamiento poslectura.

27. Seleccione “File/Export” (Archivo/exportar) y, a continuación, haga clic en “Results” (Resultados) para exportar los resultados a un archivo Excel. Los resultados aparecerán como se muestra en la ilustración 19.

		Muestra VIC 1						Muestra FAM 1				
12	Comments:											
13	SDS v1.2											
14												
15	Well	Sample Name	Marker	Task	Passive Ref	Allele X	Allele Y	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality Value	Method
16	A1	sample 1	VIC	Unknown	247.897	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.184	6.221	Undetermined	100.00	Manual Call
17	A2	sample 1	VIC	Unknown	295.565	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.451	6.805	Undetermined	100.00	Manual Call
18	A3	sample 2	VIC	Unknown	351.338	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.595	6.2	Undetermined	100.00	Manual Call
19	A4	sample 2	VIC	Unknown	379.909	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.553	6.01	Undetermined	100.00	Manual Call
20	A5	sample 3	VIC	Unknown	372.895	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.913	5.329	Undetermined	100.00	Manual Call
21	A6	sample 3	VIC	Unknown	359.717	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.806	5.278	Undetermined	100.00	Manual Call
22	A7	sample wt	VIC	Unknown	343.536	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.569	1.948	Undetermined	100.00	Manual Call
23	A8	sample wt	VIC	Unknown	277.677	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.684	2.015	Undetermined	100.00	Manual Call
24	A9	C-	VIC	Unknown	330.943	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.623	1.967	Undetermined	100.00	Manual Call
25	A10	C-	VIC	Unknown	314.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.672	2.013	Undetermined	100.00	Manual Call
26	A11	C-	VIC	Unknown	269.500	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.82	1.892	Undetermined	100.00	Manual Call
27	A12	C+	VIC	Unknown	211.520	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.249	6.14	Undetermined	100.00	Manual Call
28	B1	C+	VIC	Unknown	270.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.346	6.894	Undetermined	100.00	Manual Call
29	B2	C+	VIC	Unknown	365.112	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.265	6.528	Undetermined	100.00	Manual Call
30	B3	ER	VIC	Unknown	372.150	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.214	2.03	Undetermined	100.00	Manual Call
31	B4	ER	VIC	Unknown	404.145	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.419	2.295	Undetermined	100.00	Manual Call
32	B5	ER	VIC	Unknown	410.977	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.681	2.52	Undetermined	100.00	Manual Call
33	B6	H2O	VIC	Unknown	395.431	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.655	1.346	Undetermined	100.00	Manual Call
34	B7	H2O	VIC	Unknown	415.223	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.727	1.241	Undetermined	100.00	Manual Call
35	B8	H2O	VIC	Unknown	366.885	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.606	1.277	Undetermined	100.00	Manual Call

Ilustración 19. Ejemplo de resultados como aparecen en un archivo Excel.

Protocolo: qPCR en el equipo LightCycler 480

Al utilizar un equipo de qPCR con placa de 96 pocillos, se recomienda realizar todas las mediciones por duplicado, tal como se indica en la tabla 8.

Tabla 8. Número de reacciones para el equipo LightCycler 480

Muestras	Reacciones
Con la mezcla de primers y sondas JAK2 V617F (PPM-JAK2)	
24 muestras de ADN	24 x 2 reacciones
3 controles de ADN	3 x 2 reacciones (PC-VF, NC-VF, y COS-VF, cada una analizada por duplicado)
Control de agua	2 reacciones

Procesamiento de muestras en el equipo LightCycler 480

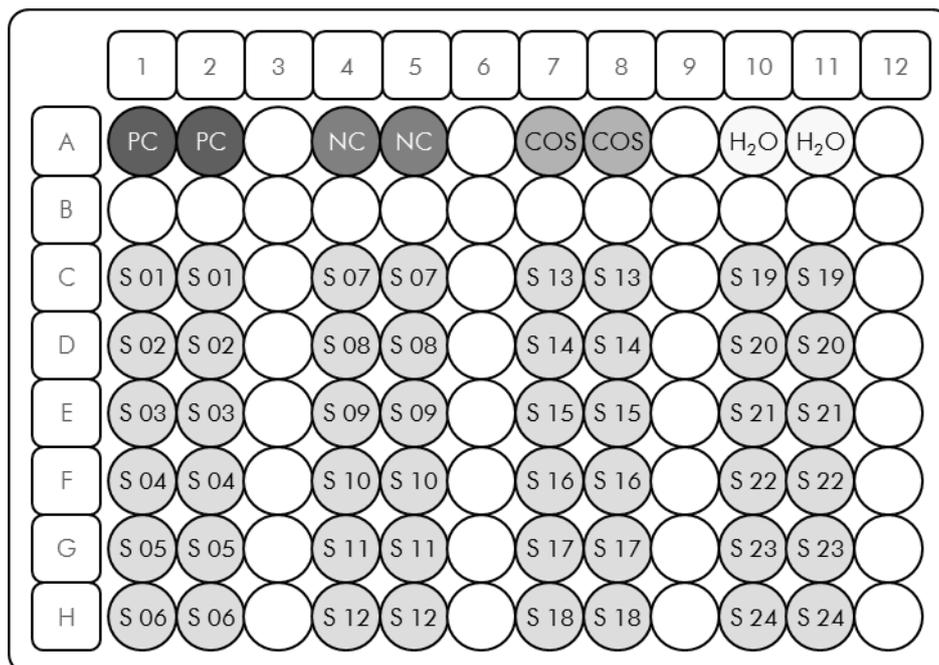


Ilustración 20. Sugerencia de configuración de la placa para un experimento con el kit ipsogen JAK2 MutaScreen. PC: control positivo; NC: control negativo; COS: muestra discriminadora; S: muestra de ADN; H₂O: control de agua.

qPCR en el equipo LightCycler 480

Nota: coloque los componentes en hielo en todos los pasos.

Procedimiento

- 1. Descongele todos los componentes necesarios y colóquelos en hielo.**
Los componentes deben retirarse del congelador aproximadamente 10 min antes de comenzar el procedimiento.
- 2. Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente todos los tubos (aproximadamente 10 s a 10.000 rpm) para recoger el líquido en el fondo del tubo.**
- 3. Prepare 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 9 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. Se puede preparar un premezcla, según el número de reacciones, con la misma mezcla de primer y sonda. Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

En el equipo LightCycler 480, el kit *ipsogen JAK2 MutaScreen* se puede utilizar para analizar 24 muestras por duplicado en 1 experimento (ilustración 20), 20 muestras por duplicado en 2 experimentos o 15 muestras por duplicado en 3 experimentos.

Tabla 9. Preparación de la mezcla de qPCR

Componente	Número de reacciones (μ l)				Concentración final
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Mezcla de primers y sondas, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Agua exenta de nucleasas de calidad PCR	5	285	145	95	–
Muestra (añadir en el paso 6)	5	5 en cada una	5 en cada una	5 en cada una	–
Volumen total	25	25 en cada una	25 en cada una	25 en cada una	–

* 24 muestras; 1 experimento/kit

† 10 muestras; 2 experimentos/kit

‡ 5 muestras; 3 experimentos/kit

4. **Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente la mezcla de qPCR (aproximadamente 10 s a 10.000 rpm) para recoger el líquido en el fondo del tubo.**
5. **Dispense 20 μ l de la premezcla de qPCR por pocillo.**
6. **Agregue 5 μ l del material de ADN de muestra o de controles en el pocillo correspondiente (volumen total: 25 μ l).**
7. **Mezcle suavemente pipeteando arriba y abajo.**
8. **Cierre la placa y centrifugue brevemente (300 x g, aproximadamente 10 s).**
9. **Coloque la placa en el termociclador según las recomendaciones del fabricante.**
10. **En la página de inicio, seleccione “New Experiment” (Nuevo experimento).**

11. Con LightCycler 480 I, siga el paso 11a. Con LightCycler 480 II, siga el paso 11b.

Si desea obtener información detallada sobre la programación del equipo LightCycler 480, consulte la guía de usuario del equipo. Para obtener una mejor visión general, los parámetros de configuración del software aparecen resaltados dentro de un cuadro en negrita.

11a. LightCycler 480 I: Seleccione “Multi Color Hydrolysis Probe” (Sonda de hidrólisis multicolor), haga clic en “Customize” (Personalizar) y, a continuación, compruebe que estén seleccionados los canales “FAM (483–533)” y “Hex (533–568)” (VIC) (ilustración 21). Configure el volumen de reacción en “25” μ l (ilustración 21) y proceda con el paso 12.

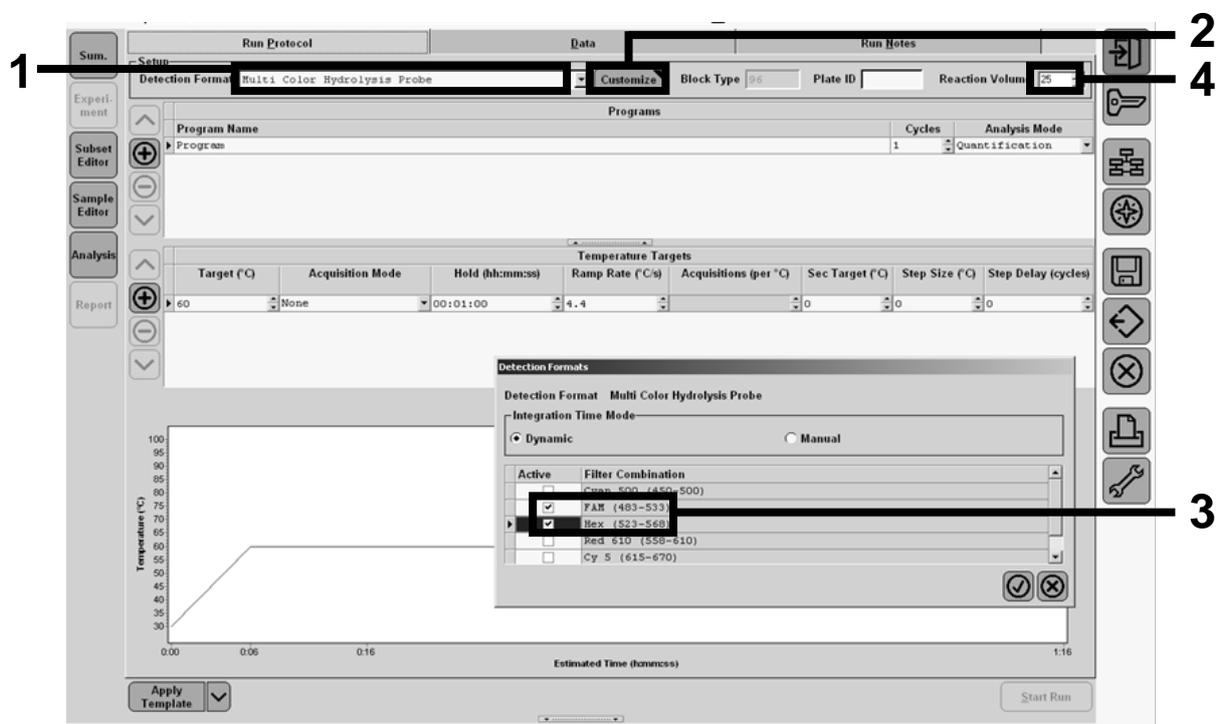


Ilustración 21. LightCycler 480 I: Configuración del formato de detección.

11b. LightCycler 480 II: Seleccione “Dual Color Hydrolysis Probe” (Sonda de hidrólisis de dos colores), haga clic en “Customize” (Personalizar) y, a continuación, compruebe que estén seleccionados los canales “FAM (465–510)” y “VIC / HEX / (533–580)” (ilustración 22). Configure el volumen de reacción en “25” μ l (ilustración 22) y proceda con el paso 12.

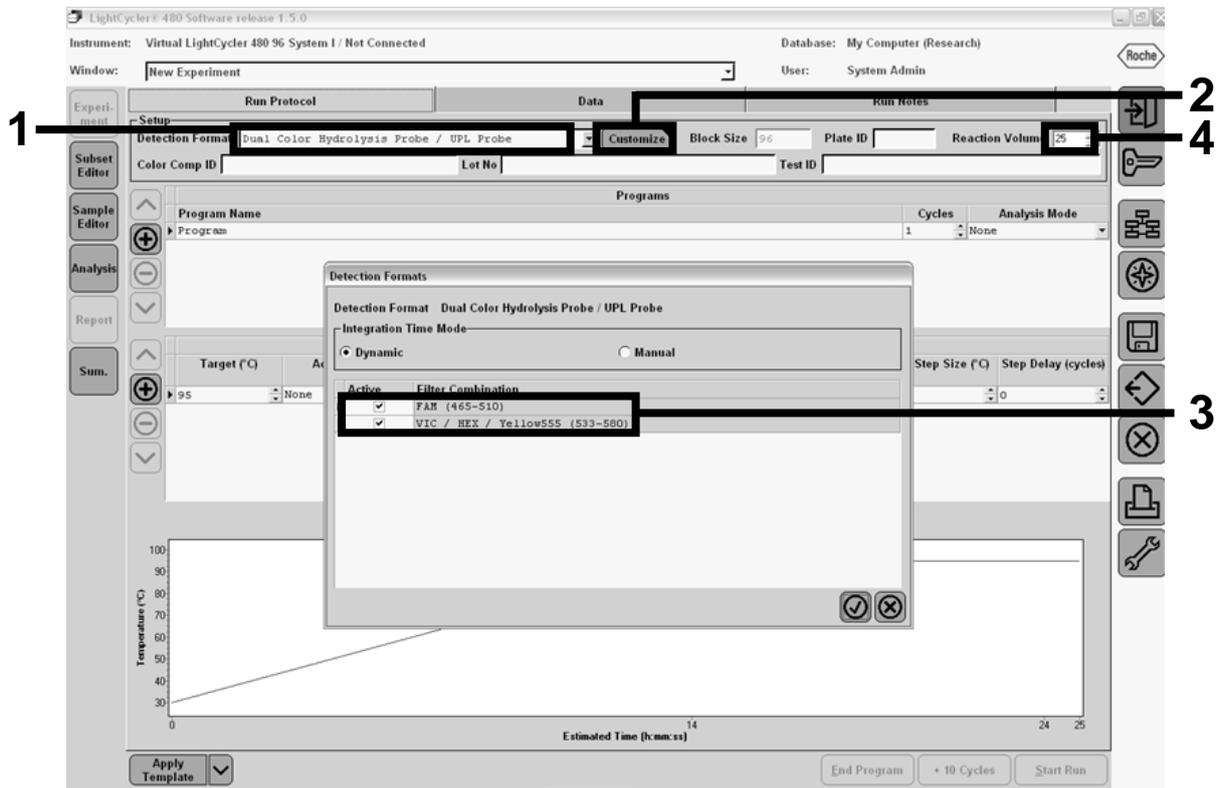


Ilustración 22. LightCycler 480 II: Configuración del formato de detección.

12. Programe el termociclador con el programa de ciclado térmico tal como se indica en la tabla 10 e inicie el análisis.

Nota: cuando describa la configuración de la placa en el equipo, seleccione "Endpt Geno" (Gen. fase fin.) en el apartado "Step 1: select workflow" (Paso 1: seleccionar flujo de trabajo).

Tabla 10. Perfil de temperatura para el equipo LightCycler 480

"Hold" (Pausa)	Temperatura: 50 °C Tiempo: 2 min
"Hold 2" (Pausa 2)	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 min
"Cycling" (Ciclado)	50 repeticiones 92 °C durante 15 s; modo de adquisición único (single) 60 °C durante 1 min; modo de adquisición único (single)
"Hold 3" (Pausa 3)	60 °C durante 1 min; modo de adquisición único (single)

Procedimiento de análisis de fase final para el equipo LightCycler 480

- Una vez finalizada la serie, haga clic en "Analysis" (Análisis).
- En el cuadro de diálogo "Create New Analysis" (Crear nuevo análisis), seleccione "Endpoint Genotyping" (Genotipado de fase final) y, a continuación, seleccione el subtipo que vaya a analizarse en el menú "Subset" (Subtipo) (ilustración 23).

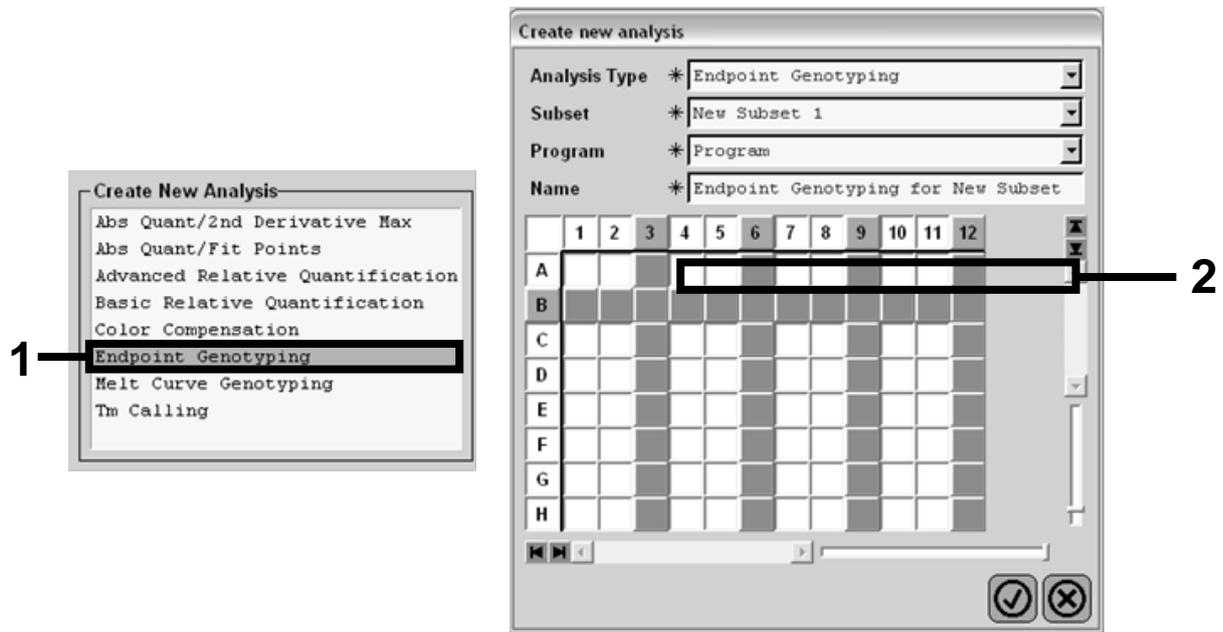


Ilustración 23. Selección del tipo y el subtipo de análisis que se va a realizar.

- En la siguiente ventana, seleccione la fluorescencia "Hex" (VIC) para "Allele X" (Alelo X) y la fluorescencia "FAM" para "Allele Y" (Alelo Y) (ilustración 24).

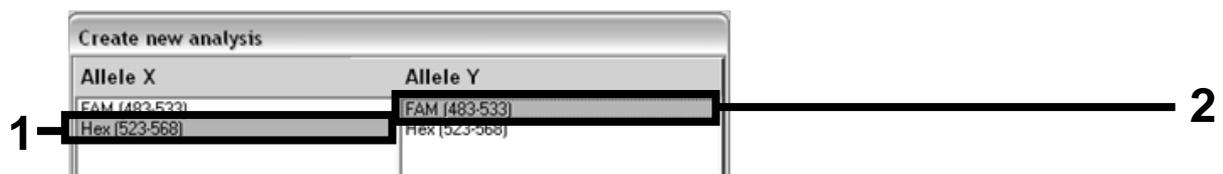


Ilustración 24. Selección de la fluorescencia para "Allele X" (Alelo X) y "Allele Y" (Alelo Y).

16. La siguiente ventana (ilustración 25) muestra la configuración de la placa (1, parte superior izquierda), los resultados de fluorescencia de cada muestra (2, parte inferior izquierda) y el diagrama de dispersión con la discriminación alélica (3, derecha; fluorescencia FAM y VIC medida en el ciclo número 50 de la PCR).

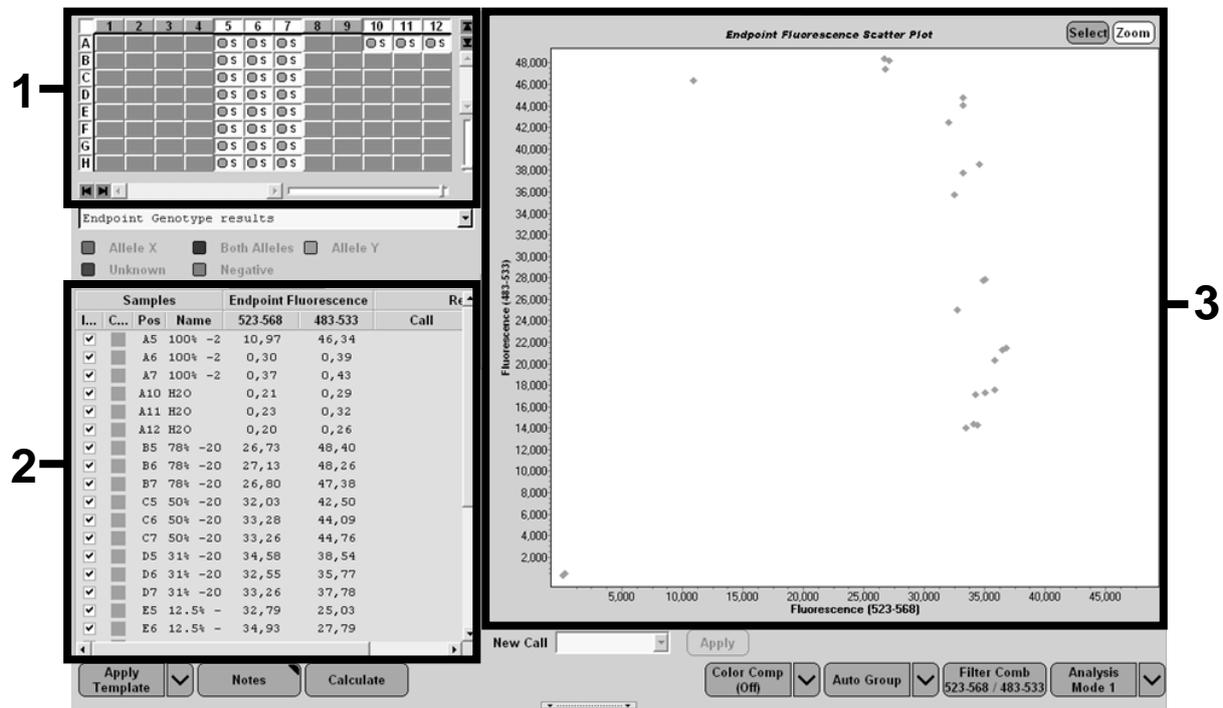


Ilustración 25. Resumen de los datos.

17. Para exportar los datos, haga clic con el botón derecho del ratón en el molde de resultados de la muestra y seleccione "Export Table" (Exportar tabla). El archivo se guardará en formato de texto (.txt).

18. Para ver y analizar los resultados, abra el archivo con Excel. Los resultados aparecerán como se muestra en la ilustración 26.

	A	B	C	D	E	F	G
1	Experiment: OB 08-12-16 Active filters: FAM (483-533), Hex (523-568)						
2	Include	Color	Pos	Name	523-568	483-533	Call
3	True	10789024	A5	100%-20	10,971	46,335	0,00
4	True	10789024	A6	100%-20	0,302	0,392	0,00
5	True	10789024	A7	100%-20	0,369	0,425	0,00
6	True	10789024	A10	H2O	0,207	0,290	0,00
7	True	10789024	A11	H2O	0,233	0,319	0,00
8	True	10789024	A12	H2O	0,203	0,261	0,00
9	True	10789024	B5	78%-20	26,731	48,396	0,00
10	True	10789024	B6	78%-20	27,125	48,262	0,00
11	True	10789024	B7	78%-20	26,803	47,383	0,00
12	True	10789024	C5	50%-20	32,035	42,495	0,00
13	True	10789024	C6	50%-20	33,278	44,086	0,00
14	True	10789024	C7	50%-20	33,261	44,760	0,00
15	True	10789024	D5	31%-20	34,584	38,536	0,00
16	True	10789024	D6	31%-20	32,549	35,766	0,00
17	True	10789024	D7	31%-20	33,262	37,780	0,00
18	True	10789024	E5	12.5%-20	32,794	25,028	0,00
19	True	10789024	E6	12.5%-20	34,932	27,788	0,00
20	True	10789024	E7	12.5%-20	35,089	27,848	0,00
21	True	10789024	F5	5%-20	35,838	20,289	0,00
22	True	10789024	F6	5%-20	36,786	21,487	0,00
23	True	10789024	F7	5%-20	36,546	21,319	0,00
24	True	10789024	G5	2%-20	35,082	17,334	0,00
25	True	10789024	G6	2%-20	35,834	17,589	0,00
26	True	10789024	G7	2%-20	34,299	17,124	0,00
27	True	10789024	H5	0%-20	34,449	14,315	0,00
28	True	10789024	H6	0%-20	33,520	14,012	0,00
29	True	10789024	H7	0%-20	34,125	14,335	0,00
30							

VIC
FAM

Ilustración 26. Ejemplo de resultados como aparecen en un archivo Excel.

Protocolo: qPCR en el equipo LightCycler 2.0

Nota: debido a requisitos tecnológicos particulares, los experimentos con LightCycler 2.0 tienen que realizarse con reactivos específicos. Recomendamos utilizar LightCycler TaqMan Master. Siga las instrucciones del fabricante para preparar Master Mix 5x.

Al utilizar un rotor de 32 capilares, se recomienda realizar todas las mediciones por duplicado, tal como se indica en la tabla 11.

Tabla 11. Número de reacciones para el equipo LightCycler 2.0

Muestras	Reacciones
Mezcla de primers y sondas JAK2 V617F (PPM-VF) (32 reacciones)	
12 muestras de ADN	12 x 2 reacciones
3 controles de ADN	3 x 2 reacciones (PC-VF, NC-VF, y COS-VF, cada una analizada por duplicado)
Control de agua	2 reacciones

Procesamiento de muestras en el equipo LightCycler 2.0

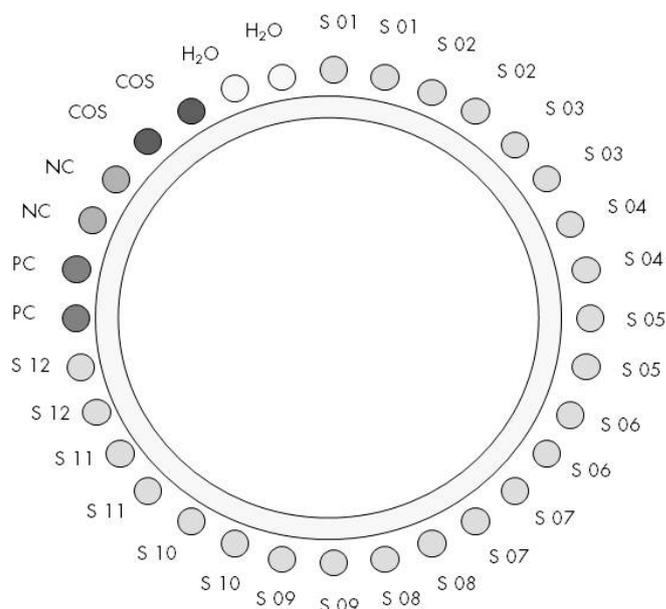


Ilustración 27. Sugerencia de configuración del rotor para un experimento con el kit ipsogen JAK2 MutaScreen. PC: control positivo; NC: control negativo; COS: muestra discriminatoria; S: muestra de ADN; H₂O: control de agua.

qPCR en el equipo LightCycler 2.0

Nota: coloque los componentes en hielo en todos los pasos.

Procedimiento

1. Descongele todos los componentes necesarios y colóquelos en hielo.

Los componentes deben retirarse del congelador aproximadamente 10 min antes de comenzar el procedimiento.

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

3. Prepare 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 12 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. Se puede preparar un premezcla, según el número de reacciones, con la misma mezcla de primer y sonda. Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

En el equipo LightCycler 2.0, el kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen se puede utilizar para analizar 12 muestras por duplicado en 1 experimento (ilustración 27).

Tabla 12. Preparación de la mezcla de qPCR para el equipo LightCycler 2.0

Componente	Número de reacciones (μ l)		Concentración final
	1	32+1	
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	132	1x
Mezcla de primers y sondas, 10x	2	66	1x
Agua exenta de nucleasas de calidad PCR	9	297	–
Muestra (añadir en el paso 4)	5	5 en cada una	–
Volumen total	20	20 en cada una	–

4. Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente la mezcla de qPCR (aproximadamente 10 s a 10.000 rpm) para recoger el líquido en el fondo del tubo.
5. Dispense 15 μ l de la premezcla de qPCR por capilar.
6. Agregue 5 μ l del material de ADN de muestra o de controles en el capilar correspondiente (volumen total: 20 μ l).
7. Mezcle suavemente pipeteando arriba y abajo.
8. Coloque los capilares en el adaptador suministrado con el equipo y centrifugue brevemente (700 x g, aproximadamente 10 s).
9. Cargue las muestras en el termociclador según las recomendaciones del fabricante.
10. Programe el termociclador (ilustración 28) con el programa tal como se indica en la tabla 13.

Si desea obtener información detallada sobre la programación del equipo LightCycler 2,0, consulte la guía de usuario del equipo. Para obtener una mejor visión general, los parámetros de configuración del software aparecen resaltados dentro de un cuadro en negrita.

Nota: asegúrese de establecer el ajuste en cuantificación y adquisición únicas de fluorescencia FAM y adquisición única de fluorescencia VIC

tanto en el paso de amplificación/ciclado como en la fase de pausa final a 60 °C.

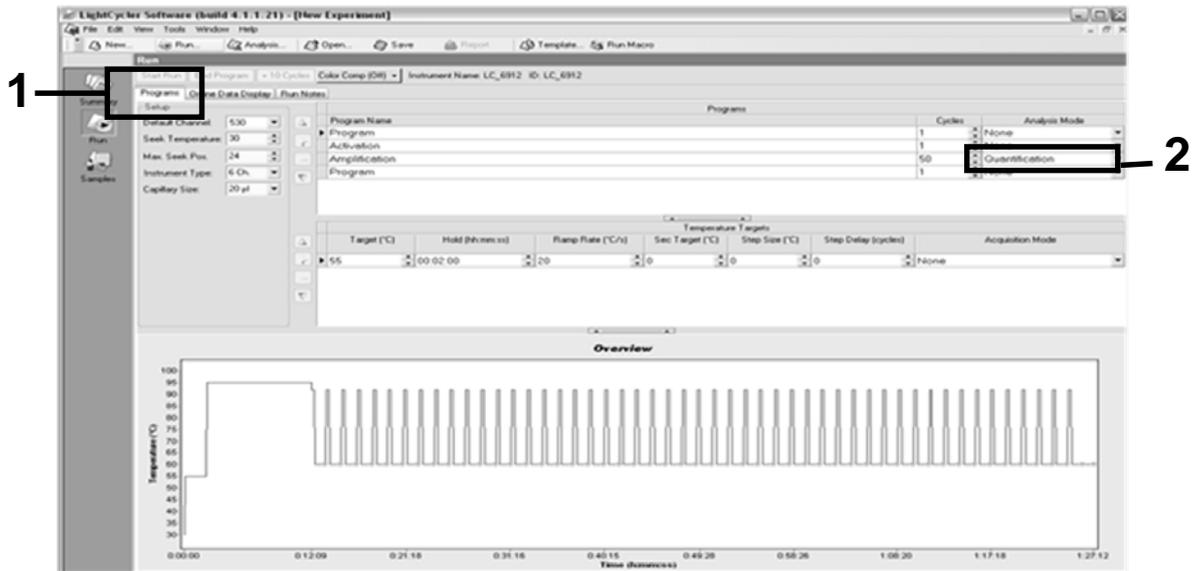


Ilustración 28. Pantalla de programación de LightCycler 2.0.

Tabla 13. Perfil de temperatura para el equipo LightCycler 2.0

"Hold" (Pausa)	Temperatura: 55 °C Tiempo: 2 min Rampa: 20
"Hold 2" (Pausa 2)	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 min Rampa: 20
"Cycling" (Ciclado)	50 repeticiones 92 °C durante 15 s; rampa: 20 60 °C durante 1 min; rampa: 20
"Hold 3" (Pausa 3)	60 °C durante 1 min; rampa: 20

Procedimiento de análisis de fase final para el equipo LightCycler 2.0

11. Cuando acabe la serie de amplificación, haga clic en la pestaña “Online Data Display” (Pantalla de datos en línea) (ilustración 29). Abra el menú de visualización situado en la parte superior izquierda de la ventana “Current Fluorescence” (Fluorescencia actual) y escriba 51 en “Acquisition no.” (N.º de adquisición).

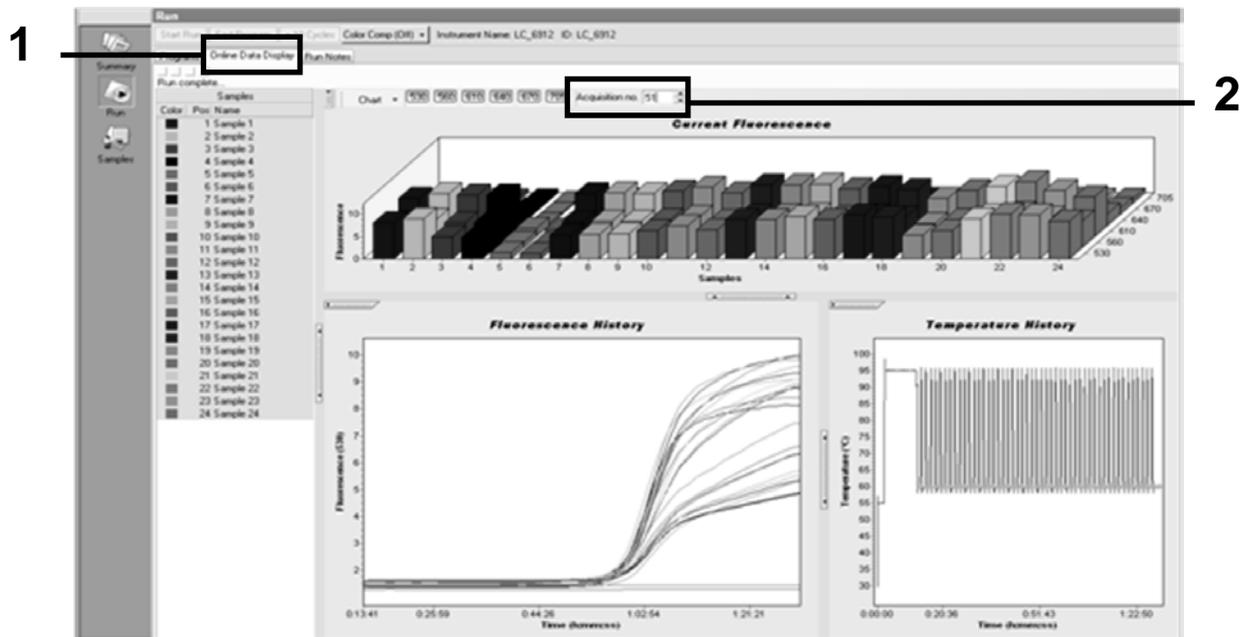


Ilustración 29. Resultados e historial de “Online Data Display” (Pantalla de datos en línea).

12. Haga clic con el botón derecho del ratón en el gráfico “Current Fluorescence” (Fluorescencia actual) y seleccione “Export” (Exportar).

13. Haga clic en la opción "Excel" de "Export chart" (Fráfico de exportación) (ilustración 30). Introduzca un nombre en el campo de diálogo "Filename" (Nombre del archivo). Seleccione un destino de exportación para el archivo de resultados con el botón . Haga clic en "Export" (Exportar).

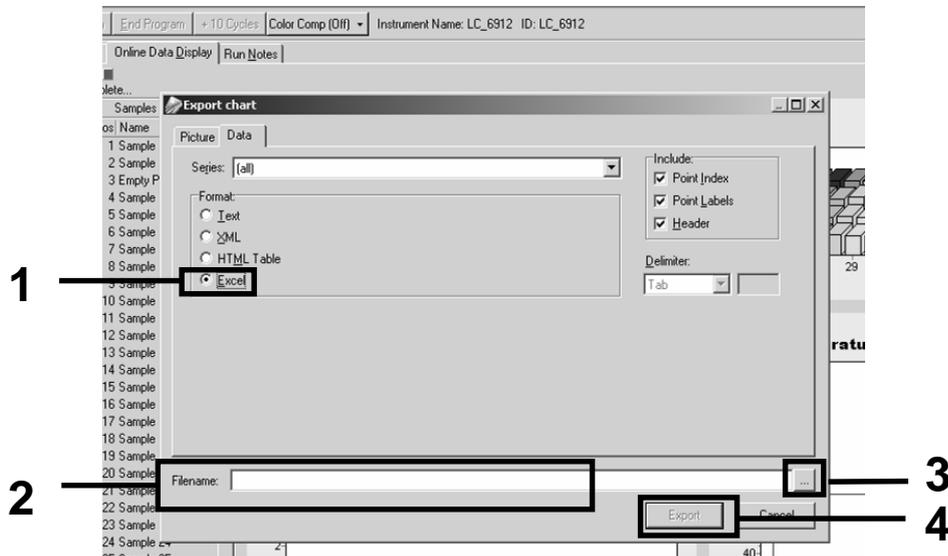


Ilustración 30. Selección del formato de exportación y el destino del archivo de datos.

14. Para ver y analizar los resultados, abra el archivo con Excel. Los resultados de LightCycler 2.0 se mostrarán tal como se indica a continuación.

		Posición															
I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U					
X	Bar	Text	X	Bar	Text	X	Bar	Text	Bar	Text	Bar						
1	2,9709	1: Sample 1 (610)	1	8,2734	1: Sample 1 (560)	1	6,6361	1: Sample 1 (530)	1	4,9943							
2	3,0182	2: Sample 2 (610)	2	8,4428	2: Sample 2 (560)	2	6,7659	2: Sample 2 (530)	2	5,0767							
3	2,9496	3: Sample 3 (610)	3		3: Sample 3 (560)	3	6,5568	3: Sample 3 (530)	3	4,9699							
4	2,9526	4: Sample 4 (610)	4	8,2887	4: Sample 4 (560)	4	6,6163	4: Sample 4 (530)	4	4,9119							
5	2,9450	5: Sample 5 (610)	5	8,2689	5: Sample 5 (560)	5	6,6209	5: Sample 5 (530)	5	4,9638							
6	2,9969	6: Sample 6 (610)	6	8,4184	6: Sample 6 (560)	6	6,7674	6: Sample 6 (530)	6	5,1209							
7	3,0045	7: Sample 7 (610)	7	8,4520	7: Sample 7 (560)	7	6,7506	7: Sample 7 (530)	7	5,0507							
8	3,2822	8: Sample 8 (610)	8	9,1936	8: Sample 8 (560)	8	7,3960	8: Sample 8 (530)	8	5,5314							
9	3,0274	9: Sample 9 (610)	9	8,5557	9: Sample 9 (560)	9	6,8437	9: Sample 9 (530)	9	5,0843							
10	2,8336	10: Sample 10 (610)	10	7,9713	10: Sample 10 (560)	10	6,3905	10: Sample 10 (530)	10	4,7883							
11	2,8275	11: Sample 11 (610)	11	7,9774	11: Sample 11 (560)	11	6,3874	11: Sample 11 (530)	11	4,7669							
12	2,8351	12: Sample 12 (610)	12	8,0171	12: Sample 12 (560)	12	6,4118	12: Sample 12 (530)	12	4,7944							
13	2,9511	13: Sample 13 (610)	13	8,3726	13: Sample 13 (560)	13	6,6957	13: Sample 13 (530)	13	4,9699							
14	2,8367	14: Sample 14 (610)	14	8,0217	14: Sample 14 (560)	14	6,4439	14: Sample 14 (530)	14	4,7654							
15	2,9908	15: Sample 15 (610)	15	8,4337	15: Sample 15 (560)	15	6,7445	15: Sample 15 (530)	15	5,0523							
16	2,8885	16: Sample 16 (610)	16	8,1498	16: Sample 16 (560)	16	6,5568	16: Sample 16 (530)	16	4,9577							
17	3,0152	17: Sample 17 (610)	17	8,4901	17: Sample 17 (560)	17	6,8193	17: Sample 17 (530)	17	5,1225							

Ilustración 31. Ejemplo de resultados de LightCycler 2.0 como aparecen en un archivo Excel.

Interpretación de los resultados

Obtenga un archivo adecuado para extraer los datos exportados para todos los equipos (Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM u otro equipo Rotor-Gene, LightCycler 2.0 ó 480, sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7300 ó 7500, ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS o 7900HT SDS) y compruebe los niveles de fluorescencia (los de los duplicados deben ser uniformes).

Prepare una representación gráfica (diagrama de dispersión) de los datos de fluorescencia. El eje x es la fluorescencia VIC y el eje y es la fluorescencia FAM.

Representación gráfica y criterios de control de calidad

En la ilustración 32 se muestra un ejemplo de diagrama de dispersión.

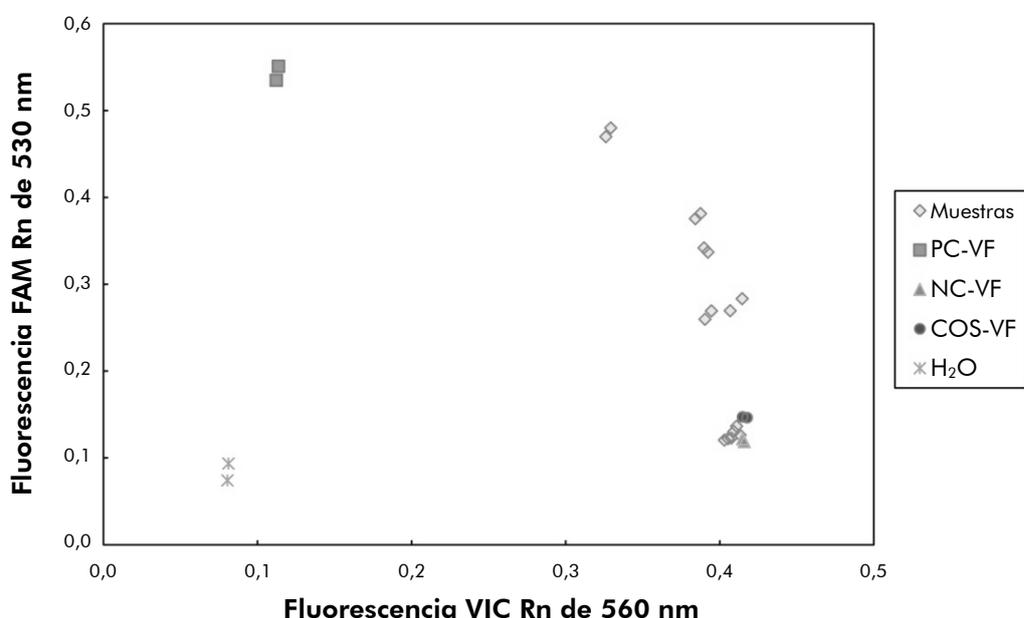


Ilustración 32. Diagrama de dispersión de un experimento de discriminación alélica representativo. Equipos: Rotor-Gene Q, Applied Biosystems, ABI PRISM y LightCycler 480.

Las muestras deben ubicarse en el arco que conecta los controles negativos (NC) con los controles positivos (PC).

La aparición de cualquier control en una posición incorrecta puede indicar un error experimental.

- Los controles positivos deben ubicarse en la parte superior izquierda.
- Los controles negativos deben ubicarse en la parte inferior derecha.
- La ubicación inadecuada de un control negativo puede indicar que existe contaminación.
- La muestra discriminadora debe aparecer por encima de los controles negativos.

- Los controles de agua deben estar situados en la parte inferior izquierda.
- La aparición de un control de agua en una posición incorrecta (por encima del NC para la medida del FAM o por encima del PC para el VIC) puede indicar que existe contaminación.

Nota: la posición de los controles puede ser diferente en el análisis de datos del equipo LightCycler 2.0 (consulte la ilustración 33). Sin embargo, los controles de agua también deben estar situados en la parte inferior izquierda.

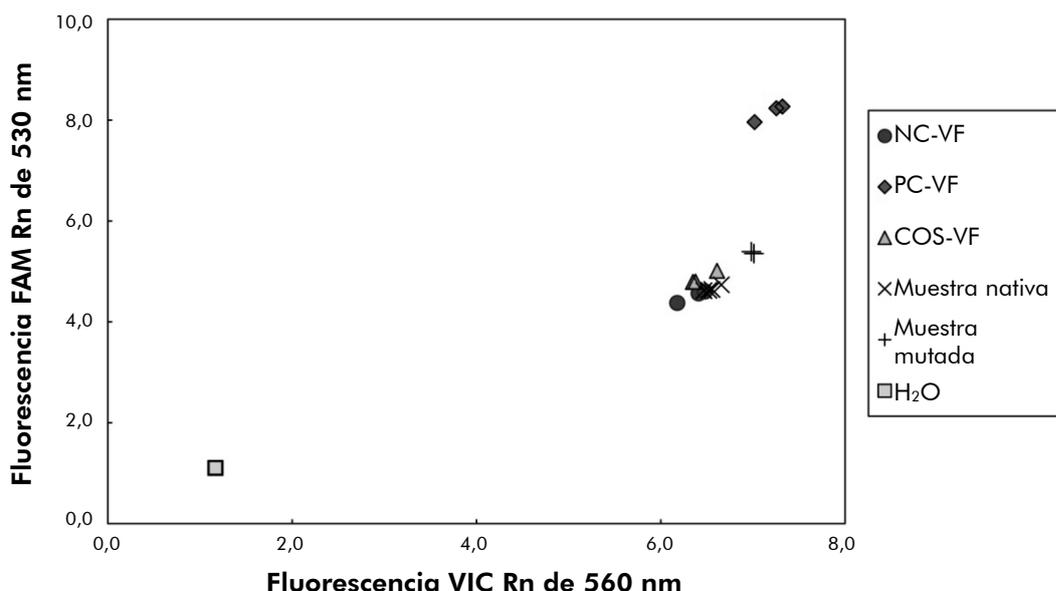


Ilustración 33. Diagrama de dispersión de un experimento de discriminación alélica representativo. Equipo: LightCycler 2.0.

Cálculo del cociente FAM/VIC normalizado y genotipado

Calcule los cocientes FAM/VIC de todas las muestras. Calcule los cocientes FAM/VIC del control positivo (PC), la muestra discriminadora (COS) y el control negativo (NC). Los cocientes de los duplicados deben ser uniformes. Calcule el cociente medio de todos los duplicados.

Calcule el cociente normalizado (Valor NRatio) para la muestra discriminadora (COS) y para todas las muestras:

$$\text{Valor NRatio}_{\text{Sample}} = \frac{\text{Cociente}_{\text{Muestra}}}{\text{Cociente}_{\text{NC}}}$$

Nota: la zona gris (GZ) de una prueba se define como un área de valores donde el rendimiento discriminatorio no es lo suficientemente preciso. Un valor en la zona gris indica que no se puede determinar si el marcador diana está presente o ausente. Esta zona gris debe calcularse para cada experimento.

Calcule la zona gris o área de incertidumbre en torno al cociente normalizado del COS (NRatiocos):

$$\text{GZ: } [(NRatiocos \times 0,94); (NRatiocos \times 1,06)]$$

Compare el cociente normalizado de cada muestra con el NRatiocos de la GZ. En la tabla 14 se ofrece una interpretación de los resultados y la tabla 15 proporciona un ejemplo de cálculo e interpretación de datos.

Tabla 14. Interpretación de resultados de genotipado mediante cocientes normalizados

Resultados	Interpretación
$NRatio_{Muestra} > NRatiocos \times 1,06$	Se ha detectado el alelo V617F del JAK2
$NRatio_{Muestra} < NRatiocos \times 0,94$	No se ha detectado el alelo V617F del JAK2
$NRatio_{Muestra}$ dentro del NRatiocos de la GZ	Resultado no concluyente

Tabla 15. Ejemplo de cálculo e interpretación de datos de fluorescencia

Muestra	VIC	FAM	Cociente	Cociente medio	Valor NRatio	Interpretación
NC	2,415	1,782	0,738	0,747	1,000	Mutación no detectada
NC	2,46	1,861	0,757			
PC	1,241	5,606	4,517	4,672	6,253	Mutación detectada
PC	1,182	5,706	4,827			
COS	1,91	1,832	0,959	0,958	1,282	Muestra discriminadora
COS	2,035	1,946	0,956			
S 1	2,311	1,783	0,772	0,742	0,992	Mutación no detectada
S 1	2,555	1,818	0,712			
S 2	1,097	5,745	5,237	4,276	5,723	Mutación detectada
S 2	1,437	4,764	3,315			
S 3	2,265	2,149	0,949	0,927	1,241	Resultado no concluyente
S 3	2,435	2,206	0,906			
S 4	2,385	2,063	0,865	0,904	1,210	Resultado no concluyente
S 4	2,322	2,191	0,944			
GZ	1,205	1,359				

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 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 “Información de contacto”, en la página 64).

Comentarios y sugerencias

Control positivo, señal negativa

- | | |
|---|--|
| a) Error de pipeteo | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.
Repita la PCR. |
| b) Almacenamiento incorrecto de los componentes del kit | Almacene el kit <i>ipsogen JAK2 MutaScreen</i> a una temperatura de entre -30 y -15 °C y mantenga la mezcla de primers y sondas (PPM) protegida de la luz. Consulte “Almacenamiento y manipulación de reactivos”, en la página 11.
Evite congelar y descongelar repetidamente.
Alicuotee los reactivos para su almacenamiento. |

Los controles negativos son positivos

- | | |
|-----------------------|--|
| Contaminación cruzada | 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. |
|-----------------------|--|

Comentarios y sugerencias

Ausencia de señal, ni siquiera en los controles positivos

- | | |
|--|--|
| a) Error de pipeteo u omisión de reactivos | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.
Repita la PCR. |
| b) Efectos inhibidores del material de la muestra causados por una purificación insuficiente | Repita la preparación del ADN. |
| c) LightCycler: se ha seleccionado un canal de detección incorrecto | Configure el ajuste de canal en F1/F2 ó 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler: no se ha programado la adquisición de datos | Compruebe los programas del ciclo.
Seleccione el modo de adquisición único (single) al final de cada segmento de annealing del programa de PCR. |

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

- | | |
|--|---|
| Calidad de ADN baja o concentración reducida | Verifique siempre la calidad y la concentración del ADN antes de empezar. |
|--|---|

LightCycler: intensidad de fluorescencia demasiado baja

- | | |
|---|--|
| a) Almacenamiento incorrecto de los componentes del kit | Almacene el kit <i>ipsogen JAK2 MutaScreen</i> a una temperatura de entre -30 y -15 °C y mantenga la mezcla de primers y sondas (PPM) protegida de la luz. Consulte "Almacenamiento y manipulación de reactivos", en la página 11.

Evite congelar y descongelar repetidamente.

Alicuotee los reactivos para su almacenamiento. |
| b) Cantidad inicial de ADN diana demasiado baja | Aumente la cantidad de ADN de la muestra.
Nota: según el método seleccionado para la preparación del ADN, pueden producirse efectos inhibidores. |

Comentarios y sugerencias

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 ó 530 nm/640 nm. |
| b) Centrifugación insuficiente de los capilares | <p>La mezcla para PCR preparada todavía puede estar en el conducto superior del capilar, o puede que una burbuja de aire esté atrapada en la punta del capilar.</p> <p>Centrifugue siempre los capilares cargados con la mezcla de reacción como se describe en el manual de uso específico del equipo.</p> |
| c) Superficie externa de la punta del capilar sucia | Utilice siempre guantes cuando manipule los capilares. |

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *ipsogen JAK2 MutaScreen* 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

Antes de utilizar este dispositivo, los usuarios deben recibir la formación pertinente y estar familiarizados con esta tecnología. 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.

La interpretación de los resultados de diagnóstico obtenidos debe realizarse en combinación con otros resultados clínicos o de laboratorio. 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.

Debe prestar especial atención a las fechas de caducidad impresas en las cajas y etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.

Características de rendimiento

Estudios no clínicos

Se realizaron estudios no clínicos para establecer el rendimiento analítico del kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen.

Precisión

Se analizaron tres niveles de dilución de ADN genómico de líneas celulares que incluían la mutación JAK2 V617F en ADN nativo con el kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen. Las diluciones correspondían a cargas de mutación del 1%, el 2% y el 3%. Se obtuvieron lotes de dilución independientes para cada nivel y se analizaron réplicas de estas diluciones en 3 experimentos independientes. Se compararon los cocientes obtenidos para cada muestra de ADN ($\text{Cociente}_{\text{Muestra}}$) con el cociente del control negativo (100% ADN nativo de JAK2, $\text{Cociente}_{\text{NC}}$). Los resultados se resumen en la tabla 16.

Tabla 16. Datos de precisión para estudios no clínicos

Nivel de mutación	$\text{Cociente}_{\text{Muestra}} > \text{Cociente}_{\text{NC}}$	%CV (cociente)
ADN con V617F al 1%	100% (n = 183)	6,8
ADN con V617F al 2%	100% (n = 72)	4,5
ADN con V617F al 3%	100% (n = 135)	5,1

Datos analíticos entre laboratorios

Se realizó un estudio en varios centros que incluía 13 laboratorios. Los datos analíticos se recopilaron a partir de diluciones de ADN genómico que incluían la mutación JAK2 V617F en ADN nativo. Se realizaron tres experimentos en cada laboratorio. Para cada experimento, se analizaron las siguientes muestras de ADN de líneas celulares:

- 1 control negativo (NC) con 0% V617F
- 1 control positivo (PC) con 100% V617F
- 1 muestra discriminadora (COS) con 2% V617F
- 3 muestras que incluían cargas de mutación intermedias (20%, 50% y 80%)

Los experimentos se llevaron a cabo en 7 modelos de equipos diferentes:

- ABI PRISM 7000 SDS
- Sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7300
- Sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500
- ABI PRISM 7700 SDS
- ABI PRISM 7900 SDS
- LightCycler 2.0
- iCycler®

Los resultados se resumen en la tabla 17.

Tabla 17. Datos analíticos entre laboratorios obtenidos de diluciones de ADN genómico de líneas celulares que incluyen la mutación JAK2 V617F en ADN nativo

Detección de muestras	Muestras positivas	Muestras negativas
JAK2 V617F	177*	0
JAK2 nativa	0	36

* Las muestras positivas incluían 36 controles positivos (PC-VF), 36 muestras discriminatorias (COS-VF; 2% V617F), 34 muestras con 20% de JAK2 V617F, 35 muestras con 50% de JAK2 V617F y 36 muestras con 80% de JAK2 V617F.

Estudios clínicos

Comparación entre el kit *ipsogen JAK2 MutaScreen* y el método ARMS®

Se analizaron muestras de ADN de 141 pacientes con posible NMP en paralelo con el kit *ipsogen JAK2 MutaScreen* y un ensayo de qPCR basado en el principio del sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) (11). Los resultados de la comparación se muestran en la tabla 18 (tabla de contingencia de 2 x 3) y en la tabla 19 (porcentaje de concordancia).

Tabla 18. Comparación entre métodos: kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen y ARMS

		Resultados del método de análisis de ARMS		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 nativa (JAK2 V617F <2%)	Total
Resultados del método de análisis del kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Mutación detectada	91	0	91
	Resultado no concluyente	1	2	3
	JAK2 nativa Mutación no detectada	1	46	47
Total		93	48	n = 141

Tabla 19. Comparación entre métodos: kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen y ARMS

	Concordancia (%)	IC del 95%* (%)
Datos positivos		
Concordancia entre el kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen y ARMS	98,9	94,1-99,8
Datos negativos		
Concordancia entre el kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen y ARMS	100	92,3-100
Concordancia total	99,3	96,0-99,9

* Los intervalos de confianza se calcularon conforme a la directriz EP12-A del CLSI: "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline" (Protocolo de usuario para la evaluación del rendimiento de la prueba cualitativa; directriz aprobada).

Comparación entre el kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen y la secuenciación

Se analizaron muestras de ADN de 51 pacientes con posible NMP en paralelo con el kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen y la técnica de referencia, la secuenciación directa. No se pudo interpretar una muestra debido a un fallo en la secuenciación. Las comparaciones de los resultados obtenidos de las 50 muestras

interpretables se resumen en la tabla 20 (tabla de contingencia de 2 x 3) y en la tabla 21 (porcentaje de concordancia).

Tabla 20. Comparación entre métodos: Kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen y secuenciación

		Resultados de la secuenciación directa		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 nativa (JAK2 V617F <2%)	Total
Resultados del método de análisis del kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Mutación detectada	26	1	27
	Resultado no concluyente	0	1	1
	JAK2 nativa Mutación no detectada	2	20	22
Total		28	22	n = 50

Tabla 21. Comparación entre métodos: Kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen y secuenciación

	Concordancia (%)	IC del 95%* (%)
Datos positivos		
Concordancia entre el kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen y la secuenciación	92,9	77,4-98,0
Datos negativos		
Concordancia entre el kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen y la secuenciación	95,2	77,3-99,2
Concordancia total	93,9	83,5-97,9

* Los intervalos de confianza se calcularon conforme a la directriz EP12-A del CLSI: "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline" (Protocolo de usuario para la evaluación del rendimiento de la prueba cualitativa; directriz aprobada).

Estudio realizado en varios centros con 228 muestras de pacientes

Las muestras de ADN de los pacientes se analizaron con técnicas propias en 13 laboratorios, lo que ayudó a constituir un estudio entre laboratorios. En cada uno de los laboratorios, se realizaron 3 experimentos con ADN de líneas celulares, tal como se describe en los datos de precisión no clínicos (consulte más atrás), y con el ADN de 10 pacientes disponible en el laboratorio.

Las 228 muestras con genotipo de JAK2 conocido se analizaron en paralelo con el kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen y con métodos propios, como la PCR cualitativa, la PCR específica de alelos, la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), la secuenciación, la PCR de oligonucleótidos específica de alelos, el RFLP y la discriminación alélica. Los resultados de las comparaciones se muestran en la tabla 22 (tabla de contingencia de 2 x 3) y en la tabla 23 (porcentaje de concordancia).

Tabla 22. Comparación entre métodos: Kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen y métodos propios

		Resultados del análisis propio		
		Mutación detectada JAK2 V617F	Mutación no detectada JAK2 nativa	Total
Resultados del método de análisis del kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Mutación detectada	139	3	142
	Resultado no concluyente	5	17	22
	JAK2 nativa Mutación no detectada	3	61	64
Total		147	81	n = 228

Tabla 23. Comparación entre métodos: Kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen y métodos propios

	Concordancia (%)	IC del 95%* (%)
Datos positivos		
Concordancia entre el kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen y el análisis propio	97,9	94,0-99,3
Datos negativos		
Concordancia entre el kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen y el análisis propio	95,3	87,1-98,4
Concordancia total	97,1	93,8-98,7

* Los intervalos de confianza se calcularon conforme a la directriz EP12-A del CLSI: "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline" Protocolo de usuario para la evaluación del rendimiento de la prueba cualitativa; directriz aprobada".

Solidez: análisis de muestras de donantes sanos

Se analizaron muestras de ADN de 103 donantes de sangre sanos con el kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS. Todas las muestras fueron identificadas como JAK2 nativas. La ilustración 34 presenta un análisis de 38 muestras realizado con el equipo LightCycler 480.

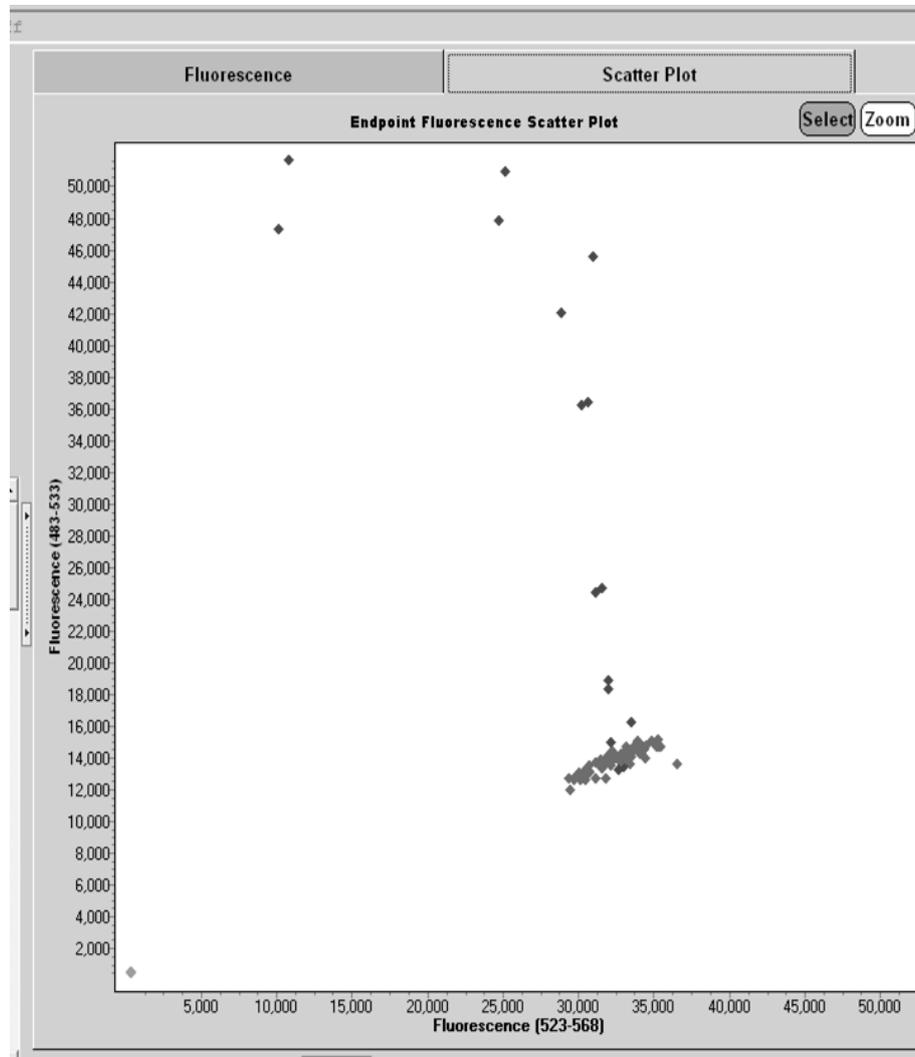


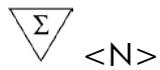
Ilustración 34. Análisis de donantes sanos. Análisis con LightCycler 480 de 38 donantes sanos (◆) realizado con el kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS (n.º de referencia 673123). Los resultados positivos por duplicado (◆) corresponden a una escala de referencia suministrada con el kit. Los valores de fluorescencia VIC aparecen representados en el eje x y los valores FAM en el eje y.

Referencias

1. Ma, W. et al. (2009) Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J. Mol. Diagn.* **11**, 49.
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
3. Levine, R.L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
5. Baxter, E.J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* **22**, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865.

Símbolos

El embalaje y las etiquetas pueden incluir los siguientes símbolos:



Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones



Fecha de caducidad



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



N.º de referencia



Número de lote



Número de material



Global Trade Item Number



Número mundial de artículo comercial



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso

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, 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	Referencia
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (10)	Para 10 reacciones: control positivo V617F, control negativo V617F, muestra discriminadora V617F, mezcla de primers y sondas JAK2 nativa y JAK2 V617F	673022
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (24)	Para 24 reacciones: control positivo V617F, control negativo V617F, muestra discriminadora V617F, mezcla de primers y sondas JAK2 nativa y JAK2 V617F	673023
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, carmesí) más un canal HRM, equipo 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, carmesí) más un canal HRM, equipo portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033

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 y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

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.

Este producto se comercializa bajo un acuerdo de licencia con Epoch Biosciences para uso exclusivo de diagnóstico in vitro y no se debe utilizar con fines de investigación, comerciales, de investigación clínica o de cualquier otro tipo fuera del ámbito del diagnóstico in vitro.

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®, *ipsogen*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, VIC® (Life Technologies); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); Excel® (Microsoft Corporation Corporation); iCycler® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); MGB™ (Epoch Biosciences).

Acuerdo de licencia limitada

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

1. El kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con el *Manual del kit ipsogen JAK2 MutaScreen* y sólo 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 MutaScreen* 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. Estos kits 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-1371-003 © 2013–2016 QIAGEN, reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

