

Abril de 2017

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



24

Versión 1



Para uso de diagnóstico in vitro

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



674023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden
ALEMANIA



R2

1103549ES

Contenido

Uso previsto	4
Resumen y explicación	4
Principio del procedimiento	9
Materiales suministrados	14
Contenido del kit.....	14
Materiales requeridos pero no suministrados	15
Advertencias y precauciones.....	17
Precauciones.....	19
Almacenamiento y manipulación de reactivos.....	21
Manipulación y almacenamiento de muestras	22
Sangre total.....	22
Muestras de ADN genómico.....	22
Procedimiento	23
Extracción y preparación del ADN genómico.....	23
Extracción manual de ADNg con el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini.....	23
Extracción automática de ADNg con el kit QIASymphony DSP DNA Mini.....	27
Cuantificación y determinación de la pureza del ADN	33
Normalización de muestras de ADN genómico	33
Protocolo: qPCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	34
Instalación del complemento Gamma e importación del perfil de ensayo.....	34
Configuración del bloque de carga y del rotor	37
Creación de una lista de trabajo.....	40

Configuración de la qPCR.....	41
Preparación del Rotor-Gene MDx e inicio de la serie de qPCR	43
Liberación y comunicación de los resultados de la qPCR.....	44
Interpretación de los resultados	46
Análisis de los datos	46
Repetición del análisis	48
Visualización de los resultados	50
Guía de resolución de problemas.....	60
Control de calidad.....	70
Limitaciones	70
Características de rendimiento	72
Límite de blanco	72
Límite de detección.....	72
Introducción de ADN	73
Repetibilidad y reproducibilidad	73
Sustancias interferentes	75
Especificidad	75
Validación clínica y comparación de métodos	76
Referencias	79
Símbolos	80
Información para pedidos.....	82

Uso previsto

El kit *ipsogen* CALR RGQ PCR es una prueba in vitro de PCR en tiempo real diseñada para la detección de mutaciones en el gen *CALR* en ADN genómico procedente de sangre total de sujetos sospechosos de padecer neoplasias mieloproliferativas (NMP). Asimismo, el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR permite identificar dos de las principales mutaciones en *CALR* (tipo 1 y tipo 2) y puede utilizarse con el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM de QIAGEN. Este producto está destinado a profesionales, tales como técnicos y médicos, expertos en técnicas de biología molecular.

Durante la manipulación de los productos, debe extremarse el cuidado y la atención.

Recomendamos a todos los usuarios de los productos de QIAGEN que sigan las directrices NIH (National Institutes of Health) desarrolladas para experimentos de ADN recombinante o bien otras directrices aplicables.

Resumen y explicación

Las neoplasias mieloproliferativas son un grupo de enfermedades que representan el 39% de las neoplasias hematológicas, las cuales se caracterizan por la acumulación crónica de distintos tipos de eritrocitos maduros en la sangre con cromosoma Filadelfia positivo (Ph+) o negativo (Ph-).

En 2005 se identificó la mutación somática recurrente V617F, que afecta al gen Janus tirosinquinasa 2 (*JAK2*) (1-4), lo que constituyó un gran avance en la comprensión, la clasificación y el diagnóstico de las NMP. Entre todos los pacientes con NMP Ph-, 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). Además, entre el 5% y el 10% de los casos de TE y MFP presentan mutaciones activadoras en el gen receptor de trombopoietina (*MPL*). No se ha identificado ningún marcador molecular específico en el 30%-45% restante de pacientes.

El descubrimiento de mutaciones somáticas en el gen *CALR* (que codifica la proteína calreticulina) en una proporción relevante de pacientes con NMP Ph⁻ ofrece un nuevo marcador de enfermedad de origen clonal (5, 6), lo que ha permitido avanzar tanto en el diagnóstico como en el pronóstico de estos casos no caracterizados anteriormente por métodos moleculares. En la mayoría de los pacientes con NMP Ph se encontraron inserciones o deleciones somáticas en el exón 9 de *CALR*, sin la mutación *JAK2*. Inicialmente se identificó un total de 36 “tipos” (Tabla 1) para *CALR* que consistían en inserciones, deleciones, sustituciones o una combinación de estas. La mayoría de ellas causan un desplazamiento del marco de lectura con el mismo marco de lectura alternativo que causa la generación de proteínas *CALR* mutantes que comparten la misma secuencia de aminoácidos nueva en el extremo C-terminal. Se sugirió que este desplazamiento del marco de lectura alteraba la locación celular de las distintas proteínas mutantes y que afectada a la función de unión Ca²⁺ de sus dominios C-terminal.

Aunque todavía no se ha dilucidado por completo el mecanismo patológico exacto, diversos estudios *in vitro* han demostrado que la sobreexpresión de la deleción de *CALR* más frecuente (mutación tipo 1, consulte la Tabla 1) causa crecimiento celular independiente de la citocina (5).

Tabla 1. Lista de mutaciones en *CALR* desde el tipo 1 hasta el tipo 36

Tipo	ID COSMIC*	Frecuencia (%)†	Notación de ADNc de <i>CALR</i> mutante
1	COSM1738055	53	c.1092_1143del
2	COSM1738056	31,7	c.1154_1155insTTGTC
3	COSM1738150	1,7	c.1095_1140del
4	COSM1738151	1	c.1102_1135del
5	COSM1738057	0,7	c.1091_1142del
6	COSM1738152	0,7	c.1094_1139del
7	COSM1738343	0,7	c.1102_1153del
8	COSM1738153	0,7	c.1104_1137del

Tipo	ID COSMIC*	Frecuencia (%)†	Notación de ADNc de CALR mutante
9	COSM1738154	0,7	c.1140del
10	COSM1738155	0,7	c.1154delinsTGTGTC
11	NI;‡ COSM1738150	0,3	[c.1092G>C;1095_1140del]
12	COSM1738359	0,3	c.1098_1131del
13	COSM1738339	0,3	c.1100_1134delinsA
14	COSM1738368	0,3	c.1101_1134del
15	COSM1738151; NI‡	0,3	[c.1102_1135del;1145C>G]
16	COSM1738157	0,3	c.1102_1137delinsCA
17	COSM1738153; NI‡	0,3	[c.1104_1137del;1148A>T]
18	COSM1738158	0,3	c.1104_1155del
19	COSM1738349	0,3	c.1110_1140del
20	COSM1738159	0,3	c.1118_1136del
21	COSM1738160	0,3	c.1118_1145delinsCGTTTA
22	COSM1738328	0,3	c.1120_1123del
23	COSM1738344	0,3	c.1120_1131delinsTGCGT
24	COSM1738345	0,3	c.1120_1138del
25	COSM1738346	0,3	c.1122_1141delinsA
26	COSM1738350	0,3	c.1122del
27	COSM1738351	0,3	c.1123_1125delinsTGTTT
28	COSM1738329	0,3	c.1131_1152del
29	COSM1738352	0,3	c.1135_1152delins CCTCCTCTTGCT
30	COSM1738353	0,3	c.1137_1154delins CCATCCTGTC
31	NI;‡ COSM1738056	0,3	[c.1151A>G;1154_1155insTTGTC]
32	COSM1738330	0,3	c.1153_1154delinsTGTC
33	COSM1738355	0,3	c.1154_1155insATGTC

Tipo	ID COSMIC*	Frecuencia (%)†	Notación de ADNc de CALR mutante
34	COSM1738331	0,3	c.1154_delinsCTTGTC
35	COSM1738356	0,3	c.1154delinsTTTGTC
36	COSM1738332	0,3	c.1155_1156insTGTCG

* ID de COSMIC v72 (cancer.sanger.ac.uk/cosmic/).

† Frecuencias según Klampfl et al (2013) (5).

‡ NI: Evento mutacional no identificado en COSMIC.

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 comprensión de la base molecular de la TE y la MFP en pacientes sin mutaciones *JAK2* y *MPL* ha sido uno de los principales objetivos en el campo de la investigación de las NMP. En este sentido, el descubrimiento de las mutaciones en *CALR* proporciona un marcador molecular adicional para tanto el diagnóstico como el pronóstico de pacientes con NMP Ph⁻. En la actualidad, la detección de la mutación en *CALR* forma parte de los criterios de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2016 para el diagnóstico de las NMP (Tabla 2) y la presencia de esta mutación se considera un criterio fundamental para la confirmación del diagnóstico.

Tabla 2. Criterios de la OMS para el diagnóstico de NMP (adaptados de la referencia 7)

Criterios de la OMS para el diagnóstico de trombocitopenia esencial

Criterio fundamental:

1. Recuento de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/l$.
2. Biopsia de médula ósea que muestra principalmente la proliferación del linaje megacariocítico con cantidades aumentadas de megacariocitos agrandados maduros con núcleo hiperlobulado. No se observa un aumento significativo en la granulocitopoyesis de neutrófilos ni en la eritropoiesis y en pocos casos un aumento menor de fibras de reticulina.
3. Incumplimiento de los criterios de la OMS para *BCR-ABL1 + LMC**, PV, MFP, síndromes mielodisplásicos (SMD) u otras neoplasias mieloides.
4. Presencia de la mutación en *JAK2*, *CALR* o *MPL*.

Criterio secundario:

Presencia de un marcador clonal o ninguna evidencia de trombocitosis reactiva

Criterios de la OMS para el diagnóstico de mielofibrosis primaria

Criterio fundamental:

1. Presencia de proliferación megacariocítica y atípia acompañadas de fibrosis reticulínica y/o colágena.
2. Incumplimiento de los criterios de la OMS para TE, PV, *BCR-ABL1 + LMC*, SMD u otras neoplasias mieloides.
3. Presencia de la mutación en *JAK2*, *CALR* o *MPL* o, en ausencia de estas mutaciones, presencia de otro marcador clonal o no evidencia de mielofibrosis reactiva.

Criterios secundarios:

Presencia de al menos una de las siguientes condiciones confirmadas en dos determinaciones consecutivas:

- a) Anemia no atribuida a una condición comórbida
- b) Leucocitosis $\geq 11 \times 10^9/l$
- c) Esplenomegalia palpable
- d) Nivel de DHL* aumentado por encima del límite superior habitual del rango de referencia del centro
- e) Leucoeritroblastosis

Criterios de la OMS para la policitemia vera

Criterio fundamental:

1. Hemoglobina (Hgb) > 16,5 g/dl en hombres, Hgb > 16,0 g/dl en mujeres; o hematocrito (Hct) > 49% en hombres, Hct > 48% en mujeres; o masa eritrocitaria aumentada.
2. Biopsia de médula ósea que muestra hiper celularidad para la edad con crecimiento trilineal (panmielosis) incluida proliferación eritroide, granulocítica y megacariocítica promitente con megacariocitos pleomórficos maduros (diferencias de tamaño).
3. Presencia de la mutación en el exón 12 de *JAK2* V617F o *JAK2*

Criterio secundario:

Nivel sérico de eritropoyetina anómalo

* LMC: leucemia mieloide crónica; DHL: deshidrogenasa láctica.

La detección de mutaciones en *CALR* en ADN_g extraído de sangre periférica ahora se utiliza como herramienta de diagnóstico en el mismo sentido que la detección de las mutaciones en *JAK2*, lo que ha simplificado y mejorado la precisión del diagnóstico en pacientes con NMP. Las pruebas para *CALR* y *JAK2* (kit *ipsogen CALR RGQ PCR* y kit *ipsogen JAK2 RGQ PCR*) se ha validado con los mismos métodos de extracción de ADN_g, por lo que puede utilizarse la misma muestra con los dos kits de qPCR.

Principio del procedimiento

El kit *ipsogen CALR RGQ PCR* es una prueba de PCR en tiempo real. Utiliza técnicas cuantitativas de PCR en tiempo real (qPCR) para la detección cualitativa de mutaciones somáticas en la región c.1091_1162 (anotación de ADNc) del exón 9 en el gen *CALR* (número de acceso CR457070 de GenBank®) (5, 6) así como para la identificación de las dos principales mutaciones en *CALR* (tipo 1 y tipo 2).

El kit contiene reactivos para realizar siete reacciones de amplificación por PCR distintas en la misma serie analítica para la identificación de las mutaciones tipo 1 y tipo 2 en *CALR* y la detección de otras variantes secundarias (enumeradas en el apartado “Características de rendimiento/Especificidad”, página 75) en ADN genómico extraído de sangre total periférica humana. El tiempo necesario para realizar todas las tareas, desde la extracción de ADNg (extracción manual o automatizada) hasta el análisis de los resultados es inferior a un día de trabajo.

El uso de la tecnología de PCR en tiempo real permite detectar de forma precisa una secuencia de ADN diana durante la fase exponencial del proceso de amplificación. Los resultados de la PCR en tiempo real se obtienen con rapidez, sin necesidad de un procesamiento posterior a la PCR, mediante la detección en tiempo real de señales fluorescentes durante los ciclos de la PCR. Actualmente existen 3 tipos principales de técnicas de qPCR: análisis de qPCR con fluoróforo SYBR® Green I, análisis de qPCR con sondas de hidrólisis y análisis de qPCR con sondas de hibridación.

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

Durante la PCR, si la diana que nos interesa está presente, tanto el primer directo como el inverso se hibridan específicamente con la sonda y la rodean. Se bloquea el extremo 3' de la sonda para evitar la extensión de la misma durante la PCR (Figura 1). Durante la fase de polimerización, la actividad de la exonucleasa 5'→3' de la ADN polimerasa escinde la

sonda, lo que causa la liberación del fluoróforo supresor y la emisión de la señal de fluorescencia del indicador. A continuación, los fragmentos de la sonda se separan de la diana y continúa la polimerización de la hebra. Esto ocurre en cada ciclo y no interfiere en la acumulación exponencial del producto (Figura 1).

El aumento de la señal de fluorescencia se detecta únicamente si la secuencia del objetivo es complementaria a los primers y la sonda y, por consiguiente, se amplifica durante la PCR.

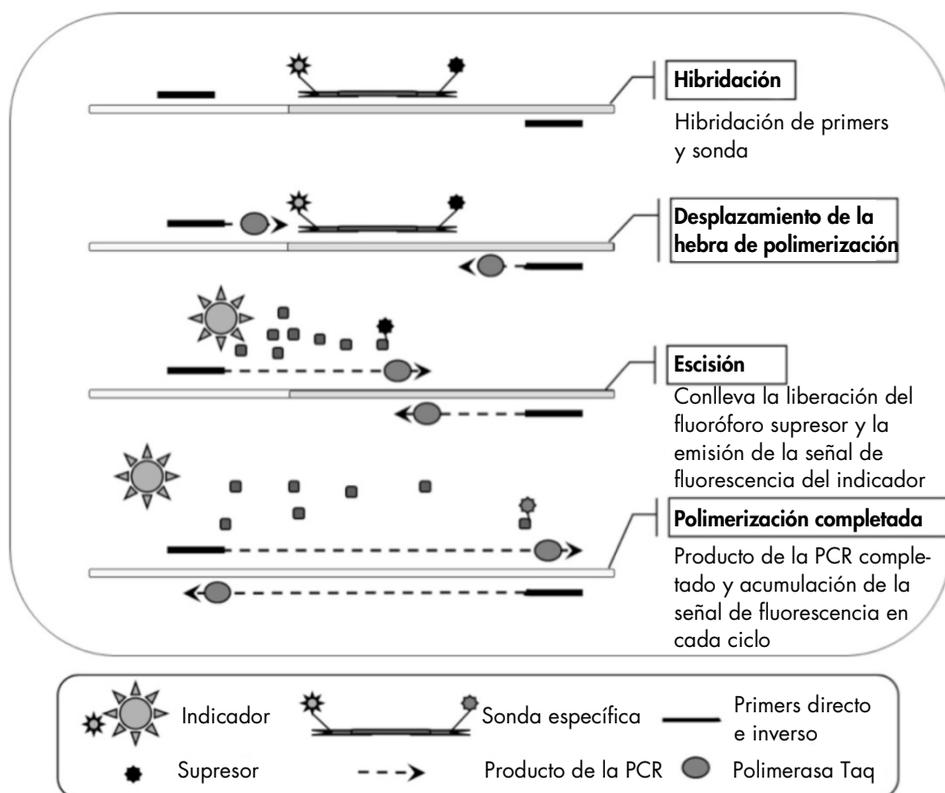


Figura 1. Principio de las reacciones de PCR en tiempo real

Identificación de las dos principales mutaciones en CALR

Con el objetivo de identificar el tipo 1 y el tipo 2 de las mutaciones en *CALR*, se lleva a cabo una amplificación específica de alelos mediante la tecnología ARMS (amplificación refractaria de sistemas de mutaciones), que utiliza la hibridación específica de los primers en una secuencia complementaria y la capacidad de la ADN polimerasa para diferenciar entre una coincidencia y un error de coincidencia en el extremo 3' de un primer de PCR.

Cuando la coincidencia con el primer para PCR es completa, la amplificación se produce con total eficacia. Cuando no hay coincidencia con la base 3', únicamente tiene lugar una amplificación de fondo de bajo nivel (Figura 2).

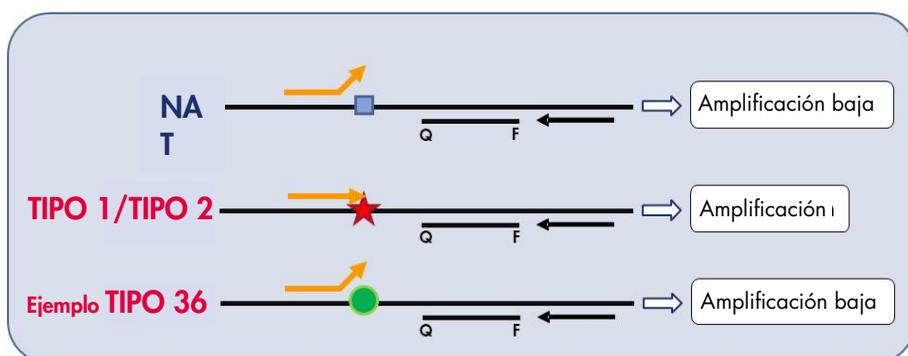


Figura 2. Identificación del tipo 1 y el tipo 2 de las mutaciones en *CALR* mediante PCR ARMS.

NAT: nativo; Q – F: sonda con doble fluoróforo BHQ® – FAM™; ⇨ primer directo (naranja) y primer inverso (negro).

Detección de variantes secundarias de las mutaciones en *CALR*

Para la detección de variantes secundarias de las mutaciones en el gen *CALR*, en las mezclas de reacción se combinan primers y sondas con un oligonucleótido adicional bloqueado en el extremo 3' con la adición de un grupo de fosfatos (denominado oligonucleótido CLAMP). El oligonucleótido CLAMP es específico de una secuencia diana nativa y, cuando se hibrida, inhibe la elongación del producto de PCR (pinza de PCR).

Cuando el molde de PCR contiene la secuencia nativa, el oligonucleótido CLAMP se hibrida antes que el primer de PCR y no se produce extensión de la ADN polimerasa, o es muy baja. Cuando hay presente un secuencia diana mutada, el oligonucleótido CLAMP no se hibrida o lo hace insuficientemente, el primer de PCR se une y se realiza la amplificación (Figura 3).

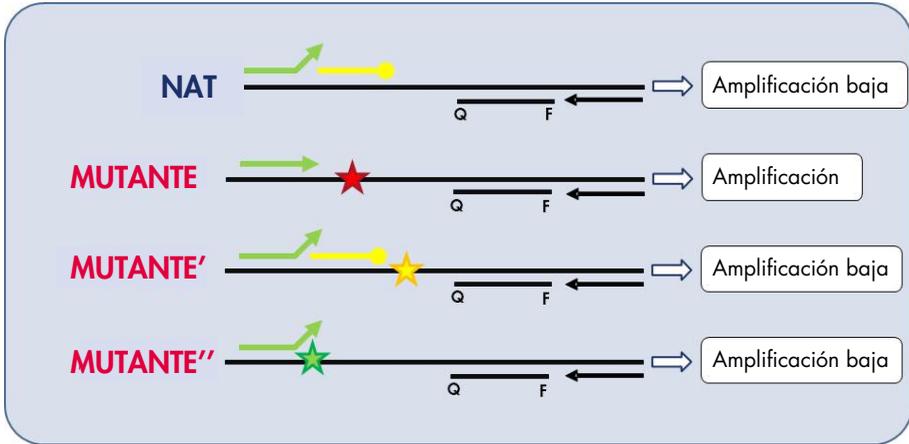


Figura 3. Detección de mutaciones secundarias en CALR. NAT: nativo; Q – F: sonda con doble fluoróforo BHQ – FAM; ⇄ primer directo (verde) y primer inverso (negro); —○: oligonucleótido con fosfatos en 3' (oligonucleótido CLAMP, amarillo).

Control de amplificación interno en todas las mezclas de reacción

Para validar y controlar la reacción de qPCR en presencia de un molde de ADN genómico (ADNg), cada mezcla de reacción de CALR incluye primers y una sonda para detectar una secuencia endógena del gen humano *ABL1*. Esta secuencia de control se amplifica en una reacción de PCR múltiple de todo el ADN mutante y nativo de *CALR* y se marca con hexaclorofluoresceína (HEXTM) para distinguirla de los amplicones marcados con amidita de fluoresceína (FAM) en las reacciones de mutación. Para ambas sondas, el fluoróforo supresor utilizado es Black Hole Quencher® (BHQ-1).

Materiales suministrados

Contenido del kit

<i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit		(24)
Número de referencia		674023
Número de reacciones		24
Color	Denominación	Volumen
Amarillo	CALR Reaction Mix Type 1 (Mezcla de reacción de TYPE 1 para CALR)	850 µl
Amarillo	CALR Reaction Mix Type 2 (Mezcla de reacción de TYPE 2 para CALR)	850 µl
Púrpura	CALR Reaction Mix CLAMP 1 (Mezcla de reacción de CLAMP 1 para CALR)	850 µl
Púrpura	CALR Reaction Mix CLAMP 2 (Mezcla de reacción de CLAMP 2 para CALR)	850 µl
Púrpura	CALR Reaction Mix CLAMP 3 (Mezcla de reacción de CLAMP 3 para CALR)	850 µl
Púrpura	CALR Reaction Mix CLAMP 4 (Mezcla de reacción de CLAMP 4 para CALR)	850 µl
Púrpura	CALR Reaction Mix CLAMP 5 (Mezcla de reacción de CLAMP 5 para CALR)	850 µl
Verde	CALR Wild-Type Control (Control nativo de CALR)	145 µl
Rojo	CALR Mutant Control (Control de mutación de CALR)	145 µl
Menta	Taq DNA Polymerase (ADN polimerasa Taq)	85 µl
Blanco	TE Buffer (Tampón TE)	1,9 ml

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 sobre seguridad (SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

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

- Pipetas exclusivas (ajustables) (1-10 μ l; 10-100 μ l; 100-1.000 μ l)

Se recomienda un mínimo de dos juegos de pipetas: uno para la preparación y la distribución de las mezclas de reacción de PCR y otro para la manipulación del ADN, incluida la carga del molde de PCR.

- Puntas de pipeta para PCR estériles, libres de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros hidrófobos
- Tubos de PCR exentos de nucleasas de 1,5 ml o 2,0 ml
- Guantes desechables
- Agitador vórtex
- Espectrofotómetro

Equipo y materiales adicionales para la extracción manual de ADN

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (n.º de referencia 61104)
- Etanol (96%-100%)

Nota: no utilice alcohol desnaturalizado, ya que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona.

- Bloque térmico para la lisis de muestras a 56 °C

- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml (capaz de alcanzar 13.000-14.000 rpm)

Equipo y materiales adicionales para la extracción automática de ADN

- QIASymphony® SP instrument (equipo QIASymphony® SP) (n.º de referencia 9001297), versión del software 4.0 o superior y accesorios suministrados incluido el protocolo Blood_200_V7_DSP
- Tube Insert 3b (Inserto 3b) (n.º de referencia 9242083)
- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kit QIASymphony DSP DNA Mini) (cat. no. 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (cartuchos para la preparación de muestras, 8 pocillos) (n.º de referencia 997002)
- 8-Rod Covers (cubiertas para 8 barras) (n.º de referencia 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (puntas con filtro de 1.500 µl) (n.º de referencia 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (puntas con filtro de 200 µl) (n.º de referencia 990332)
- Elution Microtubes CL (microtubos de elución CL) (n.º de referencia 19588)
- Tip disposal bags (bolsas para la eliminación de puntas) (n.º de referencia 9013395)
- Microtubes 2.0 ml Type H (microtubos de 2,0 ml tipo H) (Sarstedt®, n.º de referencia 72.694)

Equipo y materiales adicionales para la PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (n.º de referencia 9002032) y accesorios suministrados
- Software Rotor-Gene AssayManager® versión 2.1.x (x = 0 o superior)
- Complemento Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma versión 1.0.x (x = 0 o superior)
- Perfil del ensayo de CALR ipsogen_CALR_blood_CE versión 1.0.x (x = 2 o superior)
- Loading Block for 72 × 0.1 ml Tube (bloque de carga para 72 tubos de 0,1 ml) (n.º de referencia 9018901)
- 72-Well Rotor (rotor de 72 pocillos) (n.º de referencia 9018903)

- Adaptor Locking Ring 72-Well Rotor (anillo de fijación del adaptador para el rotor de 72 pocillos) (n.º de referencia 9018904)
- Rotor Holder (soporte del rotor) (n.º de referencia 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (tubos y tapones de tiras de 0,1 ml), para el equipo Rotor-Gene Q MDx (n.º de referencia 981103 o 981106)
- Hielo (o bloque de enfriamiento)

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 sobre seguridad (SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en 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.

Para obtener información de seguridad relacionada con los kits QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104) y QIASymphony DSP DNA Mini (n.º de referencia 937236), consulte los manuales de uso correspondientes. Para conocer la información de seguridad relativa a los equipos, consulte el manual de usuario de cada instrumento.

ADVERTENCIA Riesgo de lesiones personales



No añada lejía ni soluciones ácidas a los residuos de preparación de la muestra.

Los tampones del cartucho de reactivos del kit QIAasymphony DSP DNA Mini contienen sales de guanidina que pueden formar compuestos muy reactivos al mezclarse con lejía. Si se derrama el líquido que contienen estos tampones, límpielo con detergente específico de laboratorio y agua. Si el líquido derramado contiene agentes potencialmente infecciosos, limpie el área afectada con detergente de laboratorio y agua en primer lugar y, a continuación, con solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v).

Precauciones

La utilización de pruebas de qPCR exige la adopción de buenas prácticas de laboratorio, como la trazabilidad, el correcto mantenimiento de los equipos destinados a biología molecular, y el cumplimiento de los reglamentos y las normas aplicables vigentes.

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

- Todos los materiales químicos y biológicos son potencialmente peligrosos. Las muestras son material potencialmente infeccioso y deben tratarse como material biopeligroso.
- Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los procedimientos de seguridad local.
- Los reactivos del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR ofrecen una dilución óptima. No debe realizarse una mayor dilución de los reactivos puesto que podrían perder eficacia.
- No utilice volúmenes de reacción (mezcla de reacción más muestra) inferiores a 25 µl.
- Los procedimientos de control de calidad de QIAGEN emplean pruebas funcionales de liberación de kit para cada lote de kit por separado. Por lo tanto, no mezcle reactivos de lotes distintos ya que podría perjudicar su rendimiento.
- Asegúrese de que están instalados los archivos de perfiles de ensayo y el complemento Rotor-Gene AssayManager v2.1 requerido.
- Para conocer más advertencias, precauciones y procedimientos, consulte *Rotor-Gene Q MDx User Manual* (manual de usuario del Rotor-Gene Q MDx) y el *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager Core Application).
- Un cambio en los tiempos y las temperaturas de incubación puede causar resultados erróneos o dispares.
- Prepare todas las reacciones (mezcla de reacción y la muestra) en hielo o en un bloque de enfriamiento.
- No utilice componentes caducados o mal almacenados.

- Las mezclas de reactivos pueden verse alteradas si se exponen a la luz.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación de las mezclas con los materiales contenidos en el control de mutación de CALR y el control nativo de CALR.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación por arrastre del ADN o de los productos de la PCR, que podría producir una señal positiva falsa.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación por DNasa, que podría degradar el molde de ADN.
- Utilice pipetas individuales exclusivas para preparar las mezclas de reacción y añadir moldes.
- No abra el equipo Rotor-Gene Q MDx hasta que no haya terminado la serie analítica.
- No abra los tubos del equipo Rotor-Gene Q MDx tras la finalización de la serie analítica. Deseche los tubos conforme a los procedimientos de seguridad local.
- Es importante controlar que las pruebas se realicen correctamente, haciendo especial hincapié en la introducción incorrecta de muestras, los errores de carga y los errores de pipeteo.
- Asegúrese de que las muestras se manipulan de forma sistemática para garantizar la correcta identificación.

Por lo tanto, recomendamos lo siguiente:

- Utilizar material de laboratorio (como pipetas, puntas de pipeta, tubos de reacción) libre de nucleasas y llevar guantes cuando se realice el ensayo.
- Utilizar puntas de pipeta resistentes a los aerosoles nuevas en todos los pasos del pipeteado para evitar la contaminación cruzada entre las muestras y los reactivos.
- Preparar la premezcla maestra (master mix) para PCR con el material específico (pipetas, puntas, etc.) en una zona delimitada donde no se introduzcan matrices de ADN (ADN, plásmidos o productos de la PCR). En esta misma zona, añada el tampón TE en los tubos de NTC y ciérrelos. Añada las muestras que se van a analizar y los reactivos del control de mutación de CALR y del control nativo de CALR en una sala independiente con material específico (pipetas, puntas, etc.).

Almacenamiento y manipulación de reactivos

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

Una vez recibido, almacene inmediatamente el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR en un congelador a una temperatura constante de entre -30 °C y -15 °C y protéjalo de la luz. Si se almacena en las condiciones especificadas, el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

Una vez abiertos, los reactivos deben almacenarse en el embalaje original a una temperatura comprendida entre -30 °C y -15 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el embalaje. No es aconsejable descongelarlo y volver luego a congelarlo. No exceda un máximo de 5 ciclos de congelación-descongelación.

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

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

Manipulación y almacenamiento de muestras

Sangre total

El kit *ipsogen* CALR RGQ PCR está diseñado para su uso con muestras de ADN genómico extraídas de muestras de sangre total anticoagulada con EDTA. La sangre total puede almacenarse del modo siguiente:

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

Muestras de ADN genómico

Las muestras de ADN genómico pueden almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C durante 1 semana después de la extracción o bien entre -30 °C y -15 °C durante un máximo de 24 meses, tanto directamente después de la extracción como después de su dilución en el tampón TE.

Procedimiento

Extracción y preparación del ADN genómico

El kit *ipsogen* CALR RGQ PCR se ha validado para su uso con el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104) para la extracción manual o con el equipo QIASymphony SP junto con el kit QIASymphony DSP DNA Mini (n.º de referencia 937236) para la extracción automática.

Asegúrese de que los reactivos para la extracción del ADNg no han caducado y se han transportado y almacenado en las condiciones adecuadas.

Extracción manual de ADNg con el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini

La extracción manual de ADNg se realiza con el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (n.º de referencia 61104) según el *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook* (manual del kit QIAamp DSP DNA Blood Mini).

Antes de comenzar

- Deje que las muestras de sangre alcancen la temperatura ambiente (15 °C-25 °C) y asegúrese de que están bien homogeneizadas.
- Preparación del tampón de lisis
Si se ha formado algún precipitado en el tampón de lisis (AL), disuélvalo incubándolo a una temperatura de 56 °C.
- Preparación de la proteasa de QIAGEN
Añada 1,2 ml de disolvente de proteasa (PS) al vial de proteasa de QIAGEN (QP) liofilizada y mezcle cuidadosamente. Para evitar la formación de espuma, mezcle invirtiendo el vial varias veces. Asegúrese de que la QP se ha disuelto por completo.

Nota: una vez disuelta en PS, la QP permanece estable durante un máximo de 2 meses si se almacena a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C. Para alargar la vida de la proteasa se recomienda almacenarla a -20 °C y evitar la repetición del ciclo de congelación-descongelación. Por este motivo, es aconsejable almacenar alícuotas de QP.

- Preparación del tampón de lavado 1

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

Nota: mezcle siempre el AW1 reconstituido invirtiendo la botella varias veces antes de iniciar el procedimiento.

- Preparación del tampón de lavado 2

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

Nota: mezcle siempre el AW2 reconstituido invirtiendo la botella varias veces antes de iniciar el procedimiento.

- Preparación del tampón de elución

Con el kit se suministra una botella de tampón de elución (AE). Para evitar la contaminación del AE, se recomienda utilizar puntas de pipeta con barreras para aerosoles cuando se pipetee el AE de la botella y volver a poner el tapón de la misma inmediatamente después.

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

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

Procedimiento

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

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

2. Añada 200 µl de muestra de sangre al tubo de lisis.
3. Añada 200 µl de tampón de lisis (AL) al tubo de lisis, cierre la tapa y mezcle con un agitador vórtex en el modo de pulso durante 15 segundos y centrifugue brevemente.
Nota: para garantizar la eficiencia de la lisis, es fundamental que la muestra y el AL se mezclen bien a fin de obtener una solución homogénea.
Nota: dada la alta viscosidad del tampón AL, asegúrese de añadir el volumen correcto de AL pipeteando con cuidado y utilizando una pipeta adecuada.
Importante: no añada QP directamente al tampón AL.
4. Incube la mezcla a 56 °C (± 1 °C) durante 10 minutos (± 1 minuto).
5. Centrifugue el tubo de lisis durante aproximadamente 5 segundos a velocidad máxima para eliminar las gotas del interior de la tapa.
6. Añada 200 µl de etanol (96%-100%) al tubo de lisis, cierre la tapa y mezcle bien con un agitador vórtex en el modo de pulso durante ≥ 15 segundos.
7. Centrifugue el tubo de lisis durante ≥ 5 segundos a velocidad máxima para eliminar las gotas del interior de la tapa.
8. Aplique cuidadosamente todo el lisado del paso 7 a la columna de centrifugado QIAamp Mini sin mojar el borde. Evite tocar la membrana de la columna de centrifugado QIAamp Mini con la punta de pipeta.
Nota: si se procesan varias muestras, abra los tubos de lisis de uno en uno.
9. Cierre la tapa de la columna de centrifugado QIAamp Mini y centrifugue a aproximadamente $6.000 \times g$ (8.000 rpm) durante 1 minuto.
10. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de lavado (WT) limpio y deseche el tubo que contiene el filtrado.
Nota: si el lisado no ha traspasado completamente la membrana tras el centrifugado a $6.000 \times g$ (8.000 rpm), vuelva a centrifugar a velocidad máxima (hasta $20.800 \times g$) durante 1 minuto.
Nota: si el lisado sigue sin traspasar la membrana durante el centrifugado, deseche la muestra y repita el aislamiento y la purificación con material de muestra nuevo.

11. Abra cuidadosamente la columna de centrifugado QIAamp Mini y añada 500 μ l de tampón AW1 sin mojar el borde. Evite tocar la membrana de la columna de centrifugado QIAamp Mini con la punta de pipeta.
12. Cierre la tapa de la columna de centrifugado QIAamp Mini y centrifugue a aproximadamente $6.000 \times g$ (8.000 rpm) durante 1 minuto.
13. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de lavado limpio y deseche el tubo que contiene el filtrado.
14. Abra cuidadosamente la columna de centrifugado QIAamp Mini y añada 500 μ l de tampón AW2 sin mojar el borde. Evite tocar la membrana de la columna de centrifugado QIAamp Mini con la punta de pipeta.
15. Cierre la tapa de la columna de centrifugado QIAamp Mini y centrifugue a velocidad máxima (aproximadamente $20.000 \times g$ o 14.000 rpm) durante 1 minuto.
16. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de lavado limpio y deseche el tubo que contiene el filtrado.
17. Centrifugue a velocidad máxima (aproximadamente $20.000 \times g$ o 14.000 rpm) durante 3 minutos para secar completamente la membrana.
18. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de elución (ET) limpio y deseche el tubo de lavado que contiene el filtrado.
19. Abra cuidadosamente la tapa de la columna de centrifugado QIAamp Mini y aplique de 50 a 200 μ l de tampón AE en el centro de la membrana.
Nota: unos volúmenes de elución reducidos aumentan significativamente la concentración de ADN final en el eluido, pero reducen ligeramente la obtención de ADN general.
20. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente (15 °C-25 °C) durante 1 minuto.
21. Centrifugue a aproximadamente $6.000 \times g$ (8.000 rpm) durante 1 minuto para eluir el ADN.
22. Almacene la muestra de ADNg con las condiciones adecuadas.
23. Deseche los tubos de muestra usados, las placas y los residuos conforme a los requisitos de seguridad local.

Extracción automática de ADNg con el kit QIASymphony DSP DNA Mini

La extracción automática de ADNg se lleva a cabo con el equipo QIASymphony SP junto con el kit QIASymphony DSP DNA Mini (n.º de referencia 937236). Siga las instrucciones que encontrará en el *QIASymphony DSP DNA Kit Handbook* (manual del kit QIASymphony DSP DNA). Seleccione el protocolo **Blood_200_V7_DSP** en QIASymphony.

Nota: las características siguientes del protocolo son específicas para la extracción de ADNg de sangre total para el análisis con el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR:

- Transfiera 300 µl de sangre total a un microtubo (2,0 ml, tipo H de Sarstedt, n.º de referencia 72.694).
- El volumen de elución y la posición de salida es de **100 µl** para el protocolo de sangre total.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- El volumen global de sangre total que debe extraerse es de 200 µl (más 100 µl de volumen muerto).
- Familiarícese con el funcionamiento del equipo QIASymphony SP. Consulte los manuales de usuario suministrados con el equipo QIASymphony SP para conocer las instrucciones de funcionamiento.
- Realizar el mantenimiento opcional no es obligatorio para el funcionamiento del equipo, pero sí es muy recomendable para reducir el riesgo de contaminación.
- Antes de utilizar un cartucho de reactivos por primera vez, compruebe que los tampones QSL1 y QSB1 no contienen ningún precipitado.

En caso necesario, extraiga los contenedores que contienen tampones QSL1 y QSB1 del cartucho de reactivos e incúbelos durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C agitándolos ocasionalmente para disolver el precipitado. Asegúrese de volver a colocar los contenedores en las posiciones correctas.

Si un cartucho de reactivos ya está perforado, asegúrese de que los contenedores están sellados con tiras de sellado para reutilización e incube el cartucho de reactivos durante 30 minutos a 37 °C agitándolo ocasionalmente en un baño de agua.

- Evite agitar con fuerza el cartucho de reactivos (RC) para no generar espuma y evitar problemas de detección del nivel de líquidos.

Antes de comenzar

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

Procedimiento

1. Cierre todos los cajones y la cabina.
2. Encienda el equipo QIASymphony SP y espere hasta que aparezca la pantalla **Sample Preparation** (Preparación de muestras) y finalice el procedimiento de inicialización.
El botón de encendido está ubicado en la parte inferior, en la esquina izquierda del equipo QIASymphony SP.
3. Inicie sesión en el equipo.

4. Seleccione el protocolo que se ejecutará.
Seleccione el botón **Select All** (Seleccionar todos) y, a continuación, **DNA Blood** (Sangre ADN) y **Blood_200_V7_DSP** para las muestras de sangre total.
5. Compruebe que el cajón "Waste" (Residuos) se ha preparado correctamente. Realice una exploración del inventario del cajón "Waste" (Residuos), incluidos el conducto de puntas y el contenedor de residuos líquidos. En caso necesario, sustituya la bolsa para la eliminación de puntas.
6. Cargue la bandeja de elución correspondiente en el cajón "Eluate" (Eluido).
No cargue una placa de 96 pocillos en la ranura "Elution slot 4" (Ranura de elución 4). Utilice la ranura "Elution slot 1" (Ranura de elución 1) con el adaptador de enfriamiento correspondiente.
Si utiliza una placa de 96 pocillos, asegúrese de que esté correctamente orientada ya que, en caso contrario, se podrían mezclar las muestras en fases posteriores del análisis.
7. Cargue los cartuchos de reactivos y los fungibles necesarios en el cajón "Reagents and Consumables" (Reactivos y fungibles).
Nota: compruebe que las puntas de pipeteo están correctamente ajustadas al cajón.
8. Realice una exploración del inventario del cajón "Reagents and Consumables" (Reactivos y fungibles).
9. Transfiera 300 µl de la muestra de sangre total que se debe extraer a un microtubo (2,0 ml tipo H) y colóquelo en el adaptador 3B de 2 ml, en el transportador de muestras de tubo.
Cargue los tubos de muestras en el cajón "Sample" (Muestra).
10. Mediante la pantalla táctil, introduzca la información requerida para cada lote de muestras que se va a procesar:
 - Información de la muestra: cambie el formato de tubo predeterminado. Para ello, seleccione el botón **Select All** (Seleccionar todos) y, a continuación, **Sarstedt reference 72.694** (Sarstedt referencia 72.694) de la hoja **Tube Insert** (Inserto).
 - Confirme el protocolo seleccionado: **Blood_200_V7_DSP**.

- Volumen de elución y posición de salida: seleccione **100 µl** para el protocolo de sangre total.

Nota: una vez introducida la información sobre el lote, el estado cambia de **LOADED** (Cargado) a **QUEUED** (En cola). Cuando un lote está en cola, aparece el botón **Run** (Ejecutar).

11. Inicie la serie pulsando el botón **Run** (Ejecutar).

12. Lea y confirme el mensaje que se muestra.

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

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

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

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

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

14. Exporte el archivo de resultados del equipo QIASymphony SP: este informe se genera para cada placa de elución.

- 14a. Inserte la unidad USB en uno de los puertos USB de la parte frontal del equipo QIASymphony SP.
- 14b. Haga clic en el botón **Tools** (Herramientas).
- 14c. Seleccione **File Transfer** (Transferencia de archivos).
- 14d. En la pestaña **In-/Output Files** (Archivos de entrada/salida), seleccione **Results Files** (Archivos de resultados) y haga clic en **Transfer** (Transferir).
- Mantenga el nombre de la exportación del archivo en el siguiente formato:
aaaa-mm-dd hh:mm:ss__ID de la bandeja de elución.
15. Compruebe la columna **Validity of result** (Validez del resultado) para cada muestra del archivo de resultados del equipo QIASymphony SP.
- Estado válido y dudoso: proceda con la cualificación y la cuantificación del ADN.
 - Estado no válido: la muestra se rechaza. Vuelva a realizar el paso de extracción.
16. Si un cartucho de reactivos solo está usado parcialmente, séllelo con las tiras de sellado para reutilización suministradas y cierre los tubos que contienen la proteinasa K con tapones de rosca inmediatamente después de finalizar la serie de protocolo para evitar la evaporación.
17. Deseche los tubos de muestra usados, las placas y los residuos conforme a los requisitos de seguridad local.
18. Limpie el equipo QIASymphony SP.
- Siga las instrucciones de mantenimiento de los manuales de usuario suministrados con el equipo QIASymphony SP. Asegúrese de limpiar la protección de las puntas periódicamente para minimizar el riesgo de contaminación cruzada.
19. Cierre los cajones del equipo y apague el equipo QIASymphony SP.

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

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

Cuantificación y determinación de la pureza del ADN

Los tampones de elución utilizados en los kits de extracción del ADN_g contienen azida sódica como conservante. La absorbancia de la azida sódica tiene lugar a 260 nm y, por lo tanto, debe realizarse una medición del blanco para calibrar el espectrómetro. En función del protocolo de extracción, el tampón de elución debe utilizarse como el blanco.

- El cociente A_{260}/A_{280} debe ser $\geq 1,7$. Un cociente inferior suele indicar contaminación proteica o la presencia de sustancias químicas orgánicas que interfieren negativamente en el paso de la PCR.
- La concentración de ADN se determina mediante la medición de la absorbancia a 260 nm. Las lecturas de absorbancia a 260 nm deben estar comprendidas entre 0,1 y 1,0 para ser exactas.

Una absorbancia de 1 unidad a 260 nm se corresponde con 50 μg de ADN por ml ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$).

Cantidad total de ADN purificado (ng) = concentración de ADN (ng/ μl) \times volumen de la muestra (μl)

- Si el cociente de A_{260}/A_{280} es inferior a 1,7 y/o la concentración de ADN_g es menor que 10 ng/ μl , la muestra no debe seguir procesándose.

Normalización de muestras de ADN genómico

Diluya el ADN a 10 ng/ μl en el tampón TE suministrado con el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR.

La reacción de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx PCR está optimizada para 50 ng de ADN_g purificado diluido en un volumen de muestra final de 5 μl .

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

El kit *ipsogen* CALR RGQ PCR debe ejecutarse en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM con la interpretación automática de los resultados del software Rotor-Gene AssayManager v2.1. Los parámetros de ciclado están bloqueados para la serie.

Tómese su tiempo para familiarizarse con el equipo Rotor-Gene Q MDx y con el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 antes de iniciar el protocolo. Consulte los manuales de usuario del equipo, del software Rotor-Gene AssayManager v2.1 y del complemento Gamma para obtener más información.

Instalación del complemento Gamma e importación del perfil de ensayo

El software Rotor-Gene AssayManager v2.1 debe estar instalado en el ordenador conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx. El software puede descargarse desde la sección **Operating Software** (Software operativo) situada en la pestaña **Product Resources** (Recursos del producto) de la página del producto Rotor-Gene AssayManager v2.1 en www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx.

Para obtener más información sobre la instalación del software Rotor-Gene AssayManager v2.1 consulte el *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual de usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application). Para obtener más información sobre el software adicional necesario en los ordenadores conectados, consulte la *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide* (guía de inicio rápido de Rotor-Gene AssayManager v2.1).

* Si corresponde, equipo Rotor-Gene Q 5plex HRM con una fecha de producción de enero de 2010 o posterior. La fecha de producción se puede obtener del número de serie situado en la parte posterior del equipo. El número de serie presenta el formato "mmaannn", donde "mm" indica el mes de producción en dígitos, "aa" indica los dos últimos dígitos del año de producción y "nnn" indica el identificador exclusivo del equipo.

Para la interpretación automática de los resultados con el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit y software Rotor-Gene AssayManager v2.1, el complemento Gamma más reciente debe estar instalado en el software Rotor-Gene AssayManager v2.1. Consulte la pestaña **Product Resources** (Recursos del producto) de la página del producto Rotor-Gene AssayManager v2.1 en www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx para acceder a la versión más reciente del complemento.

Para obtener más información sobre la instalación del complemento, consulte el apartado "Installing Plug-ins" (Instalación de complementos) del *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual del usuario de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application).

El kit *ipsogen* CALR RGQ PCR también necesita un perfil de ensayo. El perfil contiene todos los parámetros necesarios para realizar el ciclado y el análisis del ensayo de qPCR. El perfil de ensayo de CALR (*ipsogen_CALR_blood_CE*) se corresponde con un archivo .iap que puede descargarse desde la página del producto del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR, pestaña **Product Resources** (Recursos del producto), sección **Protocol Files** (Archivos de protocolo). El perfil de ensayo debe importarse al software Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Para obtener más información sobre la instalación del complemento Gamma y el perfil de ensayo, consulte el *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual de usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application) y el *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (manual de usuario del Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in).

1. Puede descargar tanto el complemento Gamma como la versión más reciente del perfil de ensayo de CALR desde www.qiagen.com.
2. Inicie el proceso de instalación haciendo doble clic en el archivo **RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi** y siga las instrucciones de instalación.

Para obtener una descripción detallada, consulte el apartado “Installing Plug-ins” (Instalación de complementos) del *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual del usuario de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application).

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

- Seleccione la pestaña **Settings** (Ajustes) en el entorno **Configuration** (Configuración).
- En el panel **Work list** (Lista de trabajo) situado debajo de **Closed mode** (Modo cerrado), seleccione las casillas de verificación **Material number required** (Número de material requerido), **Valid expiry date required** (Fecha de caducidad válida requerida) y **Lot number required** (Número de lote requerido).

Este ajuste únicamente puede realizarlo un usuario con derechos de “Administrator” (Administrador).

3. Después de instalar el complemento Gamma, importe el perfil de ensayo de CALR (archivo .iap).
Acceda al software Rotor-Gene AssayManager v2.1 como un usuario con derechos de “Administrator” (Administrador) para Rotor-Gene AssayManager v2.1.
4. Seleccione el entorno **Configuration** (Configuración).
5. Seleccione la pestaña **Assay Profiles** (Perfiles de ensayo).
6. Haga clic en el botón **Import** (Importar).
7. Seleccione el perfil de ensayo de CALR *ipsogen_CALR_blood_CE* file en el cuadro de diálogo para abrir un archivo.
8. Haga clic en **Open** (Abrir). El perfil de ensayo se carga y se añade a la lista de perfiles de ensayo disponibles y puede utilizarse en el entorno **Setup** (Ajustes).

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

Configuración del bloque de carga y del rotor

Se recomienda analizar 6 muestras de ADN_g en el mismo experimento para optimizar el uso de los controles y las mezclas de reacción.

Cada mezcla de reacción (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 y CALR CLAMP 5) se utiliza para 9 reacciones: 6 muestras de ADN_g y 3 controles externos [1 control de mutación de CALR (MTC), 1 control nativo de CALR (WTC) y 1 control sin molde (NTC = tampón TE suministrado con el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR)].

Los esquemas que se muestran en la Figura 4 y en la Figura 5 indican la configuración del bloque de carga o el rotor para un experimento optimizado con el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR.

La posición de las mezclas de reacción y los controles de CALR está definida en el perfil de ensayo de CALR y no puede modificarse. Si las mezclas de reacción/los controles no se sitúan tal como se indica a continuación, no se podrá efectuar el análisis automático de los resultados.

Los números de la Figura 4 indican las posiciones en el bloque de carga y la posición final del rotor.

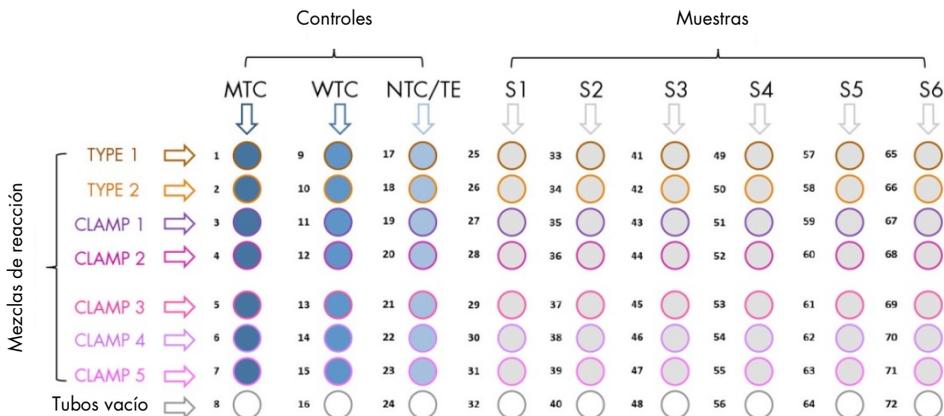


Figura 4. Configuración del bloque de carga para un experimento con el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR. TYPE 1: mezcla de reacción de TYPE 1 para CALR; TYPE 2: mezcla de reacción de TYPE 2 para CALR; CLAMP 1: mezcla de reacción de CLAMP 1 para CALR; CLAMP 2: mezcla de reacción de CLAMP 2 para CALR; CLAMP 3: mezcla de reacción de CLAMP 3 para CALR; CLAMP 4: mezcla de reacción de CLAMP 4 para CALR; CLAMP 5: mezcla de reacción de CLAMP 5 para CALR; MTC: control de mutación de CALR; WTC: control nativo de CALR; NTC/TE: control sin molde (TE); S1-S6: muestras de ADNg.

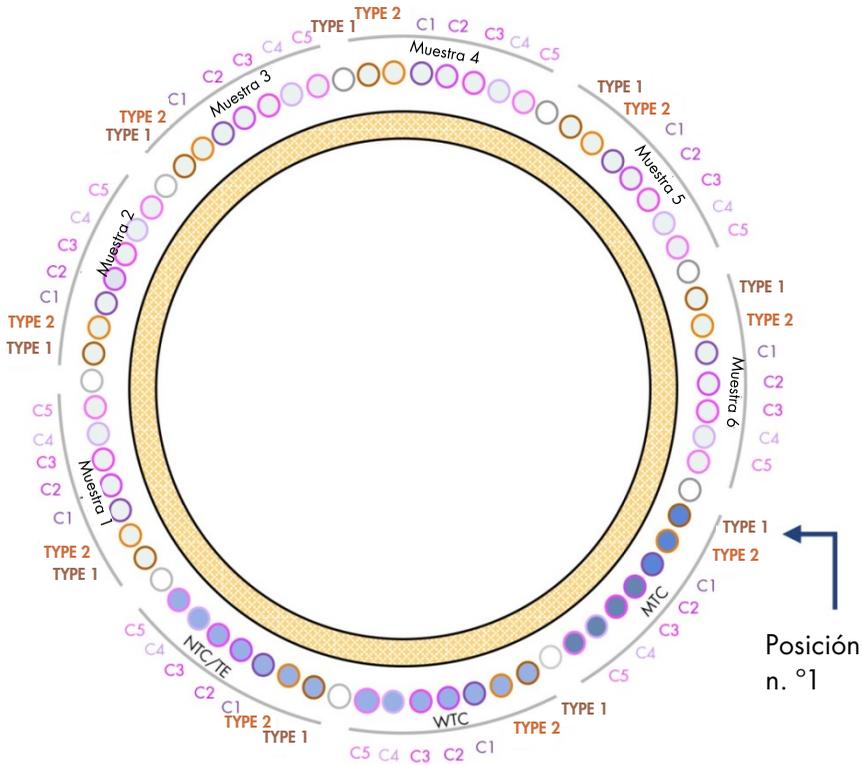


Figura 5. Configuración del rotor para un experimento con el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR. Desde la posición 1 del MTC: control de mutación de CALR; WTC: control nativo de CALR; NTC/TE: control sin molde (TE); TYPE 1: mezcla de reacción de TYPE 1 para CALR; TYPE 2: mezcla de reacción de TYPE 2 para CALR; C1: mezcla de reacción de CLAMP 1 para CALR; C2: mezcla de reacción de CLAMP 2 para CALR; C3: mezcla de reacción de CLAMP 3 para CALR; C4: mezcla de reacción de CLAMP 4 para CALR; C5: mezcla de reacción de CLAMP 5 para CALR; de muestra 1 a muestra 6: muestras de ADNg. **Nota:** el resto de posiciones  debe llenarse con tubos vacíos.

Creación de una lista de trabajo

Las funciones generales del entorno **Setup** (Ajustes) y de “Creating/Editing a Work List” (Creación/Edición de una lista de trabajo) se describen en el *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual de usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application).

Nota: el archivo de la lista de trabajo puede guardarse. La lista de trabajo puede crearse antes de cargar las muestras en el equipo o cuando el experimento está configurado en el equipo.

1. Encienda el equipo Rotor-Gene Q MDx.
2. Abra el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 e inicie sesión como usuario con función de “Operator” (Operador) en el modo cerrado.
3. Seleccione el entorno **Setup** (Ajustes).
4. Haga clic en el botón **New work list** (Nueva lista de trabajo) del gestor de listas de trabajo.
5. Seleccione el perfil de ensayo de CALR de la lista de perfiles de ensayo disponibles.
6. Haga clic en **Move** (Mover) para transferir el perfil de ensayo seleccionado a la lista **Selected assay profiles** (Perfiles de ensayo seleccionados). Ahora, el perfil de ensayo debería mostrarse en la lista **Selected assay profiles** (Perfiles de ensayo seleccionados).
7. Introduzca el número de muestras (hasta 6) en el campo correspondiente.
8. Seleccione el paso **Kit Information** (Información del kit). Utilice el código de barras del kit o introduzca manualmente la siguiente información del kit que encontrará en la tapa de la caja del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR:
 - Número de material 1100703
 - Fecha de caducidad válida
 - Número de lote

9. Seleccione el paso **Samples** (Muestras). Se muestra una lista con información detallada de las muestras. Esta lista representa la distribución prevista del rotor.
10. Introduzca los números de identificación de muestra en la lista, así como cualquier información de muestra opcional a modo de comentario en cada una de las muestras.
11. Seleccione **Properties** (Propiedades) e introduzca un nombre de lista de trabajo.
12. Marque la casilla de verificación **worklist is complete (can be applied)** (lista de trabajo completa, se puede aplicar).
13. Haga clic en **Save** (Guardar) para guardar la lista de trabajo.
14. Pulse **Print work list** (Imprimir lista de trabajo) para imprimir la lista de trabajo.
La impresión de la lista de trabajo puede facilitar la preparación y la configuración de la qPCR. La información detallada de las muestras se incluye como parte de la lista de trabajo.

Configuración de la qPCR

Antes de comenzar

- Descongele todos componentes necesarios salvo la enzima ADN polimerasa *Taq*; esta enzima debe mantenerse en el congelador cuando no se utilice. Coloque los tubos que contienen los componentes que se deben descongelar en hielo o utilice un bloque de enfriamiento.
 - Limpie la zona de trabajo dedicada a la preparación de la mezcla de PCR para reducir el riesgo de contaminación de moldes y nucleasas.
 - Mezcle en vórtex (10-12 segundos) y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos que contienen los estándares, controles y mezclas de reacción antes de utilizarlos.
1. Prepare mezclas maestras para qPCR para cada mezcla de reacción (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 y CALR CLAMP 5) **en hielo** (o utilice un bloque de enfriamiento) de acuerdo con el número de muestras que van a procesarse.

El esquema de pipeteo para la preparación de las mezclas maestras de los reactivos de CALR que aparece en la tabla siguiente se ha calculado para alcanzar volúmenes de reacción finales de 25 µl tras añadir 5 µl de ADNg o control. Se incluye un volumen adicional para compensar el error de pipeteo y permitir la preparación de suficiente mezcla maestra para 6 muestras y 3 controles externos.

Componente	1 reacción (µl)	9 + 1 reacciones (µl)*
Mezcla de reacción para CALR	19,83	198,3
Taq ADN polimerasa	0,17	1,7
Volumen total de mezcla maestra para qPCR (µl)	20	200
Distribución de mezcla maestra para qPCR	20 µl por tubo	
Distribución de muestras	5 µl por tubo	
Volumen total de reacción de qPCR	25 µl	

* Se incluye un volumen de reacción adicional para compensar el error de pipeteo.

Nota: se recomienda no pipetear volúmenes inferiores a 1 µl.

- Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente todas las mezclas maestras para qPCR.
- Coloque los tubos de tira para qPCR en un bloque de carga enfriado para 72 tubos de 0,1 ml y dispense 20 µl de las mezclas maestras para qPCR de CALR en cada tubo de tiras según la configuración del bloque de carga que se muestra en la Figura 4.
- Mezcle en vórtex y centrifugue brevemente las muestras de ADNg, el control nativo de CALR (WTC), el control para mutación de CALR (MTC) y el tampón TE (NTC). A continuación, añada 5 µl de muestra o material de control al tubo correspondiente según la configuración indicada en la Figura 4 para obtener un volumen total de 25 µl. Mezcle suavemente pipeteando arriba y abajo.

Nota: extreme la precaución a la hora de cambiar las puntas entre tubos para evitar resultados falsos positivos como consecuencia de la contaminación por molde o mezcla de reacción no específicos. Cierre todos los tubos y compruebe que no haya burbujas en el fondo de los mismos.

5. Vuelva a almacenar todos los componentes del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR según las condiciones de almacenamiento adecuadas para evitar la degradación de los materiales.

Preparación del Rotor-Gene MDx e inicio de la serie de qPCR

1. Coloque un rotor de 72 pocillos en el soporte del rotor Rotor-Gene Q MDx.
2. Rellene el rotor con tubos de tiras según las posiciones asignadas, empezando por la posición 1, tal como se indica en la Figura 5, y colocando tubos de tiras tapados vacíos en todas las posiciones que no se utilizan.

Nota: asegúrese de insertar el primer tubo en la posición 1, de orientar correctamente los tubos de tiras y de colocarlos en las posiciones adecuadas, tal como se muestra en la Figura 4 y la Figura 5.

Nota: coloque siempre la mezcla de reacción de TYPE 1 y los tres controles (MTC, WTC, NTC) en las posiciones 1, 9 y 17 para que la optimización de la ganancia (efectuada en la posición de tubo 1) se realice siempre en la misma amplificación (consulte la Figura 4 y la Figura 5).

3. Coloque el anillo de fijación.
4. Cargue el equipo Rotor-Gene Q MDx con el rotor y el anillo de fijación. Cierre la tapa del equipo.
5. En el software Rotor-Gene AssayManager v2.1, seleccione la lista de trabajo correspondiente del gestor de listas de trabajo y haga clic en **Apply** (Aplicar). Si la lista de trabajo sigue abierta, simplemente haga clic en el botón **Apply**.

Nota: si no se ha creado una lista de trabajo exclusiva para el experimento, inicie sesión en el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 y siga los pasos que se describen en el apartado "Creación de una lista de trabajo" (página 40) antes de continuar.
6. Introduzca el nombre del experimento.
7. Seleccione el termociclador que se va a utilizar en **Cycler selection** (Selección del termociclador). Debe utilizarse un termociclador Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

8. Compruebe que el anillo de fijación esté bien colocado y confírmelo en la pantalla.
9. Haga clic en **Start run** (Iniciar serie).
La serie qPCR debería empezar.
10. Una vez finalizada la serie, haga clic en **Finish run** (Finalizar serie).
Nota: el experimento se guarda en la base de datos interna solamente cuando ha finalizado este paso.

Liberación y comunicación de los resultados de la qPCR

La funcionalidad general del entorno **Approval** (Aprobación) se describe en el *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (manual de usuario del Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in).

Una vez finalizada la serie y liberado el termociclador, el experimento se guarda en la base de datos interna. El análisis de los datos adquiridos se realiza automáticamente en función del complemento del perfil de ensayo y las reglas y los valores de los parámetros definidos en dicho perfil del ensayo.

Nota: se necesita la función de usuario "Approver" (Aprobador) para aprobar una serie.

El primer paso del proceso de aprobación consiste en filtrar el ensayo que se desea aprobar. Para ello, utilice el criterio de filtro que aparece en el entorno **Approval** (Aprobación).

1. Libere y apruebe la serie.

Los usuarios que hayan iniciado sesión con la función "Approver" (Aprobador) pueden hacer clic en **Release and go to approval** (Liberar y pasar a aprobación).

Los usuarios que hayan iniciado sesión con la función "Operator" (Operador) pueden hacer clic en **Release** (Liberar).

Si ha hecho clic en **Release and go to approval** (Liberar y pasar a aprobación), se mostrarán los resultados del experimento en el entorno **Approval** (Aprobación).

Si un usuario con la función "Operator" (Operador) ha hecho clic en **Release** (Liberar), otro usuario con la función "Approver" (Aprobador) deberá iniciar sesión y seleccionar el entorno **Approval** (Aprobación).

2. Seleccione las opciones de filtro que desee para el ensayo que va a aprobar y haga clic en **Apply** (Aplicar).
3. Revise los resultados y haga clic en el botón **Release/Report data** (Liberar/Comunicar datos).
4. Haga clic en **OK** (Aceptar).

El informe se generará en formato .pdf y se guardará automáticamente en la carpeta predefinida.

La ruta de la carpeta predeterminada es **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports**.

Nota: esta ruta y la carpeta pueden modificarse en el entorno **Configuration** (Configuración).

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

Nota: se necesita un paquete de asistencia de la serie para recibir asistencia durante la resolución de problemas por parte del Centro de servicio técnico de QIAGEN. Los paquetes de asistencia pueden generarse desde los entornos **Approval** (Aprobación) o **Archive** (Archivo). Para obtener más información, consulte el apartado "Creating a support package" en el documento *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application).

Además del paquete de asistencia, también puede resultar útil el seguimiento de auditoría de ± 1 día relacionado con el incidente. El seguimiento de auditoría puede obtenerse desde el entorno **Service** (Servicio). Para obtener más información, consulte el documento *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application).

Interpretación de los resultados

Análisis de los datos

El análisis de los resultados de la qPCR para cada uno de los ensayos y las muestras es totalmente automático. El software Rotor-Gene AssayManager v2.1 analiza las curvas de amplificación y puede invalidar las curvas discordantes en función de su forma y amplitud de sonido. En este caso, se asociará un indicador con la curva invalidada. También pueden mostrarse indicadores de advertencia para las anomalías de las curvas no invalidadas.

Para determinar la validez del ensayo, Rotor-Gene AssayManager v2.1 también analiza los controles de la serie, es decir, el control nativo de CALR (WTC), el control para mutación de CALR (MTC) y el tampón TE (NTC) en los canales verde (FAM) y amarillo (HEX) de las mezclas de reacción del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 y CALR CLAMP 5). La validez de cada control se determina en función del cumplimiento de los valores de C_T de acuerdo con las especificaciones predefinidas.

Nota: si el control para la amplificación interna de un tubo determinado resulta no válido (canal amarillo), también se considerará no válida la diana específica de CALR del mismo tubo (canal verde).

Nota: cuando un control externo como mínimo resulta no válido para un ensayo de CALR concreto (p. ej., el ensayo CLAMP 1), los resultados obtenidos con dicha mezcla de reacción para todas las muestras de la prueba también se consideran no válidos. En este caso, solamente el ensayo CALR específico es inválido, pero no toda la serie de qPCR.

El software Rotor-Gene AssayManager v2.1 también analiza las muestras desconocidas mediante la comprobación de la validez del control interno para ABL1.

Por último, se asigna un estado de CALR a las muestras desconocidas. En primer lugar, el software evalúa los resultados obtenidos para los ensayos TYPE 1 y TYPE 2. Si se ha podido asignar el estado de mutación positiva de tipo 1 o tipo 2 a la muestra, se procede a determinar el estado de CALR. En este caso también se muestran los resultados obtenidos para los ensayos CLAMP con finalidad informativa.

Si no se ha podido identificar la mutación de tipo 1 ni de tipo 2, el análisis continúa con los resultados obtenidos para los ensayos CLAMP hasta que se consigue determinar el estado de CALR (es decir, mutación detectada o mutación no detectada).

Para concluir que una muestra es positiva es preciso lograr la detección en al menos uno de los siete ensayos CALR. Todos los controles asociados con los ensayos en cuestión y el control de la muestra analizada tienen que ser válidos, es decir, MTC, WTC, NTC y el control interno ABL1.

Para concluir que una muestra es negativa, la muestra tiene que ser negativa con todos los ensayos, mientras que todos los controles (MTC, WTC y NTC) de los siete ensayos CALR, así como el control interno de ABL1 de la muestra, tienen que ser válidos.

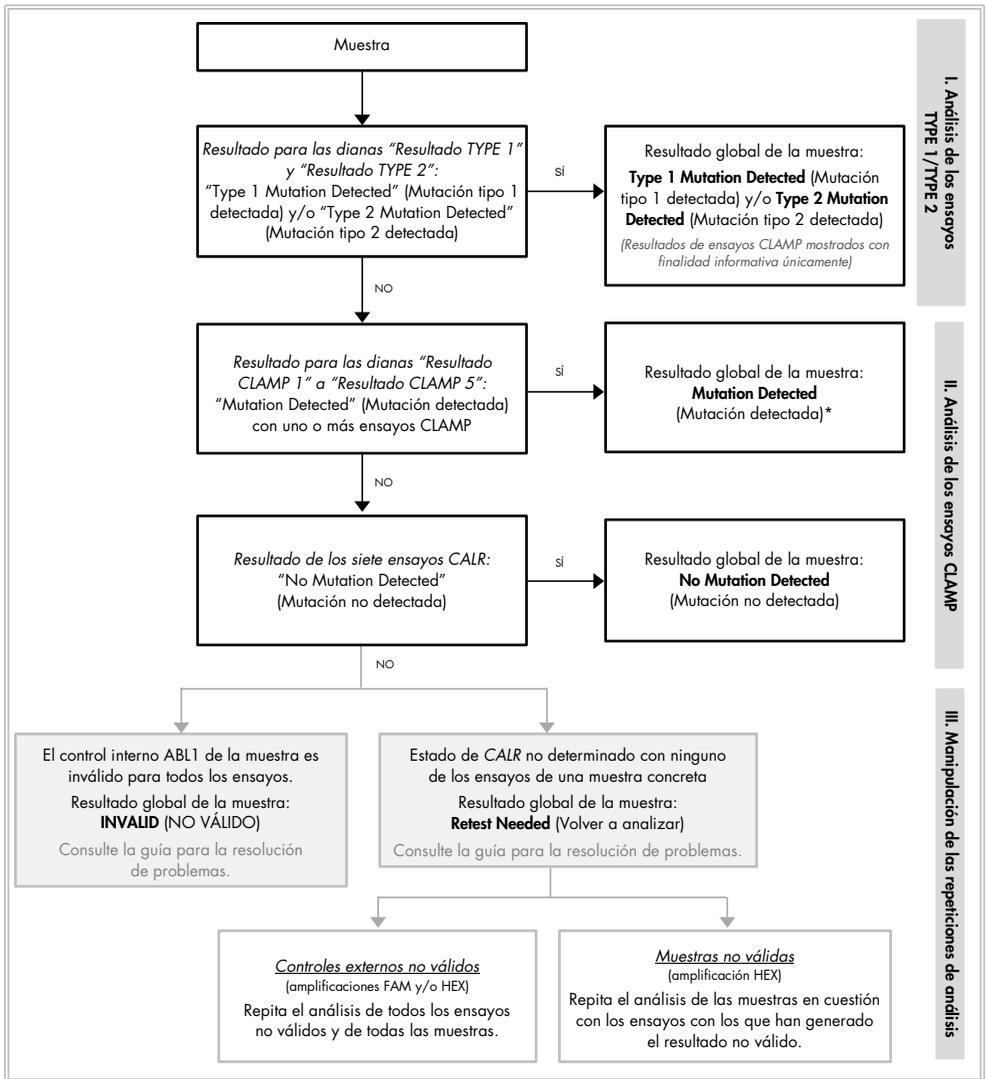
Los resultados de las muestras de la prueba, definidos y analizados automáticamente por el software Rotor-Gene AssayManager v2.1, tienen que ser aprobados y liberados por un usuario que haya iniciado sesión con la función "Approver" (Aprobador). Los resultados de las muestras por aprobar tienen tres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

En caso de resultados no válidos, consulte el apartado "Guía de resolución de problemas" en la página 60 para determinar la causa del error y poder llegar a detectar errores que requieran solución.

Repetición del análisis

En caso de obtener resultados no válidos, siga el diagrama de decisión que se muestra en la Figura 6 para determinar si es necesario repetir el análisis.

Cuando no se puede asignar el estado de *CALR* a la muestra con ninguno de los siete ensayos *CALR* no es necesario repetir el análisis.



* Si es obligatoria la identificación del tipo 1/tipo 2, puede ser necesario repetir el análisis cuando el ensayo TYPE 1 y/o TYPE 2 no es válido y la mutación no se puede identificar como (i) Tipo 1 o (ii) Tipo 2 o (iii) Negativa para tipo 1 y tipo 2.

Figura 6. Diagrama de decisiones para determinar el estado mutacional en CALR de las muestras de prueba

Nota: en los casos en que es obligatoria la identificación del tipo 1/tipo 2 y el ensayo TYPE 1 y/o TYPE 2 no es válido, puede ser necesario repetir el análisis para obtener un resultado concluyente para el ensayo TYPE 1 y/o TYPE 2, independientemente de la existencia de un ensayo CLAMP positivo.

La repetición del análisis puede resultar necesaria en otras situaciones. Cuando repita un análisis, coloque siempre la mezcla de reacción de TYPE 1 y los tres controles (MTC, WTC, NTC) en las posiciones 1, 9 y 17 para que la optimización de la ganancia (efectuada en la posición de tubo 1) se realice siempre en la misma amplificación. Asegúrese de colocar cada ensayo repetido en su posición asignada (Figura 4), aunque no todos los ensayos estén presentes en la placa.

Nota: si falta alguno de los siete ensayos de CALR durante la repetición del análisis de las muestras, todas las posiciones vacías que suelen estar ocupadas generarán un resultado "INVALID" (NO VÁLIDO) del software. Para mejorar la trazabilidad, documente las posiciones vacías y el tipo esperado de la respuesta asociada en el apartado de comentarios del informe.

Visualización de los resultados

Dianas

Los resultados de cada ensayo del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR se muestran con los siguientes nombres de diana:

- "ABL_NombreEnsayo" (p. ej., ABL_TYPE_1) para el control de amplificación interno para ABL1 (resultados del canal amarillo)
- "NombreEnsayo" para una mezcla de reacción de CALR (p. ej., TYPE 1 para la mezcla de reacción de TYPE 1 para CALR) (resultados del canal verde)
- "Resultado NombreEnsayo" (p. ej., Resultado TYPE 1). Estas dianas son dianas combinadas; el resultado correspondiente tiene en cuenta la validez de los controles (MTC, WTC, NTC y ABL1).

Resultados

Los resultados de las dianas anteriores se muestran en la columna **Result** (Resultado) del informe.

Tabla 3. Resultados visualizados para cada diana

Diana	Muestras	Resultados visualizados
ABL_NombreEnsayo (p. ej., ABL_TYPE_1)	MTC, WTC, NTC, muestras de la prueba	Internal Control Valid, INVALID (Control interno válido, NO VÁLIDO)
NombreEnsayo (p. ej., TYPE 1)	MTC, WTC, NTC	Signal, No Signal, INVALID (Señal, Ninguna señal, NO VÁLIDO)
NombreEnsayo (p. ej., TYPE 1)	Muestras de la prueba	Significant Amplification Detected, No Significant Amplification Detected, No Amplification Detected, INVALID (Amplificación significativa detectada, Amplificación significativa no detectada, Amplificación no detectada, NO VÁLIDO)
Resultado TYPE 1	Muestras de la prueba	Type 1 Mutation Detected, No Mutation Detected, INVALID (Mutación tipo 1 detectada, Mutación no detectada, NO VÁLIDO)
Resultado TYPE 2	Muestras de la prueba	Type 2 Mutation Detected, No Mutation Detected, INVALID (Mutación tipo 2 detectada, Mutación no detectada, NO VÁLIDO)
Resultado CLAMP X (p. ej., Resultado CLAMP 1)	Muestras de la prueba	Mutation Detected, No Mutation Detected, INVALID (Mutación detectada, Mutación no detectada, NO VÁLIDO)

Si alguno de los controles (MTC, WTC, NTC) vinculados a una muestra específica no es válido para un ensayo determinado, o si el control interno para ABL1 no es válido, el resultado que se muestre para el resultado de diana combinada será "INVALID" (NO VÁLIDO).

La conclusión del análisis para cada muestra se indica en la columna **Overall Sample Result** (Resultado global de la muestra) del informe.

Tabla 4. Resultados globales de las muestras

Resultado de la muestra	Descripción
Type 1 Mutation Detected (Mutación de tipo 1 detectada)	La muestra analizada contiene la mutación de tipo 1 en <i>CALR</i> .
Type 2 Mutation Detected (Mutación de tipo 2 detectada)	La muestra analizada contiene la mutación de tipo 2 en <i>CALR</i> .
Type 1 and Type 2 Mutation Detected (Mutación de tipo 1 y tipo 2 detectadas)	La muestra analizada contiene las mutaciones de tipo 1 y tipo 2 en <i>CALR</i> . Este caso es poco frecuente pero se ha observado en una ocasión durante la validación clínica del kit <i>ipsogen CALR RGQ PCR</i> .
Mutation Detected (Mutación detectada)	La muestra analizada contiene una mutación en <i>CALR</i> distinta a la de tipo 1 o tipo 2.
No Mutation Detected (Mutación no detectada)	No se ha detectado ninguna mutación en <i>CALR</i> en la muestra analizada.

Resultado de la muestra	Descripción
Retest Needed (Volver a analizar)	<p>El resultado no es concluyente porque uno o varios controles no son válidos para una o varias mezclas de reacción de CALR. El análisis debe repetirse para obtener un resultado concluyente (consulte la Figura 6).</p> <p>Ejemplo: una muestra es positiva ("Significant Amplification Detected" [Amplificación significativa detectada]) únicamente para el ensayo CLAMP 1, pero el NTC para el ensayo CLAMP 1 no es válido debido a la contaminación del pocillo. El resultado de la muestra para CLAMP 1 no se puede tener en cuenta y el resultado de CLAMP 1 se mostrará como INVALID (NO VÁLIDO). Es necesario repetir el análisis del ensayo CLAMP 1 (MTC, WTC, NTC y la muestra afectada) para confirmar el resultado positivo de la muestra.</p>
INVALID (NO VÁLIDO)	<p>El control de amplificación interno para ABL1 no es válido para la muestra analizada con las siete mezclas de reacción de CALR, mientras que todos los controles externos (MTC, WTC, NTC) son válidos. La causa más probable de este resultado es la calidad de la muestra o una normalización de la muestra incorrecta. Consulte el apartado "Guía de resolución de problemas" en la página 60 para obtener más información.</p>

Indicadores

Los indicadores se muestran para ofrecer información adicional sobre los resultados obtenidos, en concreto sobre los resultados no válidos. Las anomalías no problemáticas pueden marcarse con un indicador de advertencia que no genera un resultado no válido. Para conocer los indicadores universales incluidos en el complemento Gamma, consulte también el *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (manual de usuario del Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in).

El análisis automático del ensayo del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR puede generar los siguientes indicadores específicos del ensayo y universales:

Indicador	Descripción
Indicadores específicos del ensayo	
CONSECUTIVE_FAULT	Una diana utilizada para el cálculo de esta diana no es válida.
IC_INVALID	El control interno no es válido. La diana y el control interno comparten el mismo tubo.
INVALID_SIGNAL	Indicador específico del NTC. El valor de C_T es demasiado bajo para el control interno o la amplificación específica de CALR.
MC_HIGH_CT (CLAMP X)	El valor de C_T es demasiado alto para el control de mutación.
MC_HIGH_CT (TYPE X)	El valor de C_T es demasiado alto para el control de mutación.
MC_IC_HIGH_CT (CLAMP X)	El valor de C_T es superior al esperado para el control interno en el tubo que contiene el control de mutación.
MC_IC_HIGH_CT (TYPE X)	El valor de C_T es superior al esperado para el control interno en el tubo que contiene el control de mutación.

Indicador	Descripción
MC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	El valor de C_T es inferior al esperado para el control interno en el tubo que contiene el control de mutación.
MC_IC_LOW_CT (TYPE X)	El valor de C_T es inferior al esperado para el control interno en el tubo que contiene el control de mutación.
MC_LOW_CT (CLAMP X)	El valor de C_T es demasiado bajo para el control de mutación.
MC_LOW_CT (TYPE X)	El valor de C_T es demasiado bajo para el control de mutación.
MC_NO_CT (CLAMP X)	El valor de C_T no es detectable para el control de mutación con la mezcla de reacción de CLAMP X.
MC_NO_CT (TYPE X)	El valor de C_T no es detectable para el control de mutación con la mezcla de reacción de TYPE X.
NO_SIGNAL_IC_INVALID	No se ha detectado ninguna señal de control interno. La diana y el control interno comparten el mismo tubo.
NTC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	El valor de C_T es demasiado bajo para el control interno en el tubo que contiene el control sin molde.
NTC_IC_LOW_CT (TYPE X)	El valor de C_T es demasiado bajo para el control interno en el tubo que contiene el control sin molde.

Indicador	Descripción
NTC_LOW_CT (CLAMP X)	El valor de C_T es demasiado bajo para el control sin molde.
NTC_LOW_CT (TYPE X)	El valor de C_T es demasiado bajo para el control sin molde.
SAMPLE_CLAMP X_IC_HIGH_CT	El valor de C_T es superior al esperado para el control interno en un tubo que contiene una muestra.
SAMPLE_CLAMP X_IC_LOW_CT	El valor de C_T es inferior al esperado para el control interno en un tubo que contiene una muestra.
SAMPLE_TYPE X_IC_HIGH_CT	El valor de C_T es superior al esperado para el control interno en un tubo que contiene una muestra.
SAMPLE_TYPE X_IC_LOW_CT	El valor de C_T es inferior al esperado para el control interno en un tubo que contiene una muestra.
WTC_IC_HIGH_CT (CLAMP X)	El valor de C_T es superior al esperado para el control interno en el tubo que contiene el control nativo.
WTC_IC_HIGH_CT (TYPE X)	El valor de C_T es superior al esperado para el control interno en el tubo que contiene el control nativo.
WTC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	El valor de C_T es inferior al esperado para el control interno en el tubo que contiene el control nativo.
WTC_IC_LOW_CT (TYPE X)	El valor de C_T es inferior al esperado para el control interno en el tubo que contiene el control nativo.

Indicador	Descripción
WTC_LOW_CT (CLAMP X)	El valor de C_T es demasiado bajo para el control nativo.
WTC_LOW_CT (TYPE X)	El valor de C_T es demasiado bajo para el control nativo.
Otros indicadores	
ANALYSIS_FAILED	El ensayo se ha definido como no válido porque el análisis ha sido erróneo por varios motivos. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	La curva de amplificación de datos iniciales muestra una forma que se desvía del comportamiento establecido para este ensayo. Existe una probabilidad elevada de resultados incorrectos o de una interpretación errónea de los resultados.
FLAT_BUMP	La curva de amplificación de datos iniciales muestra una forma similar a un badén aplanado que se desvía del comportamiento establecido para este ensayo. Existe una probabilidad elevada de resultados incorrectos o de una interpretación errónea de los resultados (p. ej., determinación incorrecta del valor de C_T).
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE (Advertencia)	La variación del porcentaje de fluorescencia para esta muestra en relación con el tubo de muestra con la mayor variación de fluorescencia es inferior al límite definido.

Indicador	Descripción
NO_BASELINE	No se ha encontrado ninguna referencia inicial. No se puede realizar el análisis posterior.
RUN_FAILED	El ensayo se ha definido como no válido debido a un problema con el termociclador o con la conexión del termociclador.
RUN_STOPPED	El ensayo se ha definido como no válido porque la serie se ha detenido manualmente.
SATURATION	La fluorescencia de los datos iniciales presenta una saturación elevada antes del punto de inflexión de la curva de amplificación.
SPIKE	Se ha detectado un pico en la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación pero fuera de la región en la que se determina el valor de C_T .
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Se ha detectado un pico en la curva de amplificación próximo al valor de C_T .
STEEP_BASELINE	Se ha detectado una referencia con crecimiento abrupto para la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación.
STRONG_BASELINE_DIP	Se ha detectado un descenso abrupto en la referencia para la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación.

Indicador	Descripción
STRONG_NOISE	Se ha detectado una señal de ruido fuerte fuera de la fase de crecimiento de la curva de amplificación.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Se ha detectado una señal de ruido fuerte en la fase de crecimiento (exponencial) de la curva de amplificación.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Se ha detectado una referencia ondulante para la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir durante la valoración del estado mutacional de *CALR* mediante el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR. Para obtener información de contacto, consulte la contraportada o visite www.qiagen.com.

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

Para obtener información sobre la resolución de problemas del equipo Rotor-Gene Q MDx y el software Rotor-Gene AssayManager v2.1, consulte los manuales de usuario correspondiente.

Comentarios y sugerencias

Una muestra se detecta como positiva con varios ensayos

Cada mutación puede detectarse mediante varios ensayos

Por ejemplo, es habitual que una muestra que contiene una mutación de tipo 1 se amplifique mediante los ensayos CLAMP 1 y CLAMP 2 además de mediante el ensayo TYPE 1. En el caso de una muestra con una mutación de tipo 2, es habitual conseguir la amplificación con el ensayo CLAMP 5 además de con el ensayo TYPE 2.

Comentarios y sugerencias

Ninguna amplificación o amplificación baja del control de amplificación interno en controles externos y/o muestras

- | | |
|---|--|
| a) Mezcla de reacción y/o ADN polimerasa <i>Taq</i> y/o molde no añadidos | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Compruebe que se haya añadido todo el ADN del molde y todos los componentes de la mezcla maestra de qPCR. Repita la PCR. |
| b) Degradación de la mezcla de reacción | Almacene el contenido del kit entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantenga las mezclas de reacción protegidas de la luz. Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta) y, si es necesario, utilice un kit nuevo para repetir la PCR. |
| c) Volumen de pipeteo posiblemente incorrecto | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Compruebe que se haya añadido un volumen de $5\text{ }\mu\text{l}$ de control/muestra y un volumen de $20\text{ }\mu\text{l}$ de mezcla maestra de qPCR. Realice una inspección visual de todos los volúmenes pipeteados. Compruebe las pipetas y vuelva a calibrarlas en caso necesario antes de repetir el paso de qPCR. |
| d) Concentración de ADN demasiado baja | Compruebe la concentración de ADN de la muestra. El kit <i>ipsogen</i> CALR RGGQ PCR está optimizado para una concentración de ADN de trabajo de $10\text{ ng}/\mu\text{l}$. Si la concentración de ADN es inferior a $10\text{ ng}/\mu\text{l}$, concentre o vuelva a extraer ADN de sangre total disminuyendo el volumen de elución antes de repetir el paso de qPCR. |

Comentarios y sugerencias

- e) Contaminación proteica del ADN o presencia de sustancias químicas orgánicas
- Compruebe el cociente A_{260}/A_{280} . El cociente A_{260}/A_{280} debe ser $\geq 1,7$. Si el cociente es $< 1,7$, realice una extracción nueva de ADN y repita la PCR.

Amplificación anticipada del control de amplificación interno en controles externos y/o muestras

- a) Concentración de ADN demasiado alta
- Compruebe la concentración de ADN de la muestra. El kit *ipsogen* CALR RGQ PCR está optimizado para una concentración de trabajo de 10 ng/ μ l. Si la concentración de ADN es superior a 10 ng/ μ l, diluya el ADN en tampón TE y repita la PCR.
- b) Volumen de pipeteo posiblemente incorrecto
- Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Compruebe que se haya añadido un volumen de 5 μ l de control/muestra y un volumen de 20 μ l de mezcla maestra de qPCR. Realice una inspección visual de todos los volúmenes pipeteados.
- Compruebe las pipetas y vuelva a calibrarlas en caso necesario antes de repetir el paso de qPCR.
- c) Curva de amplificación posiblemente incorrecta
- Revise la amplificación correspondiente en busca de curvas inusuales. Repita la PCR.

Comentarios y sugerencias

Ninguna señal o señal baja para el control de amplificación interno en las muestras, pero los controles externos son válidos

- | | |
|--|---|
| a) Concentración de ADN demasiado baja | Compruebe la concentración de ADN de la muestra. El kit <i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR está optimizado para una concentración de ADN de trabajo de 10 ng/μl. Si la concentración de ADN es inferior a 10 ng/μl, concentre o vuelva a extraer ADN de sangre total disminuyendo el volumen de elución antes de repetir el paso de qPCR. |
| b) Contaminación proteica del ADN o presencia de sustancias químicas orgánicas | Compruebe el cociente A_{260}/A_{280} . El cociente A_{260}/A_{280} debe ser $\geq 1,7$. Si el cociente es $< 1,7$, realice una extracción nueva de ADN y repita la PCR. |
| c) Volumen de pipeteo posiblemente incorrecto | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Compruebe que se haya añadido un volumen de 5 μl de control/muestra y un volumen de 20 μl de mezcla maestra de qPCR. Realice una inspección visual de todos los volúmenes pipeteados.

Compruebe las pipetas y vuelva a calibrarlas en caso necesario antes de repetir el paso de qPCR. |

Comentarios y sugerencias

El control sin molde (NTC/tampón TE) es positivo (FAM y/o HEX)

- | | |
|---|--|
| a) Contaminación cruzada o contaminación de los reactivos | <p>Sustituya todos los reactivos críticos y repita la PCR.</p> <p>Manipule siempre las muestras, los componentes del kit y los fungibles según las prácticas recomendadas para evitar la contaminación por arrastre.</p> <p>Asegúrese de cambiar las puntas cada vez que pipetee reactivos distintos o al cargar tubos distintos.</p> <p>Prepare la premezcla maestra para PCR con material específico (pipetas, puntas, etc.).</p> <p>Prepare la premezcla maestra para PCR y la reacción NTC en una zona delimitada donde no se introduzcan matrices de ADN (ADN, plásmidos o productos de la PCR).</p> <p>Si fuera posible, cierre los tubos de PCR justo después de añadir la muestra que va a analizarse.</p> |
| b) Inversión de tubos de tiras y/o ID de muestra | <p>Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Repita la PCR.</p> |
| c) Degradación de la mezcla de reacción o la sonda | <p>Almacene el contenido del kit entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantenga las mezclas de reacción protegidas de la luz.</p> <p>Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta) y, si es necesario, utilice un kit nuevo para repetir la PCR.</p> |
| d) Curva de amplificación posiblemente incorrecta | <p>Revise la amplificación correspondiente en busca de curvas inusuales.</p> <p>Repita la PCR.</p> |

Comentarios y sugerencias

Ninguna amplificación o amplificación baja del control de mutación (MTC) (amplificación de FAM)

- | | |
|---|--|
| a) Mezcla de reacción y/o ADN polimerasa <i>Taq</i> no añadidos | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Compruebe que se hayan añadido todos los componentes de la mezcla maestra de qPCR. Repita la PCR. |
| b) Degradación de la mezcla de reacción | Almacene el contenido del kit entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantenga las mezclas de reacción protegidas de la luz. Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta) y, si es necesario, utilice un kit nuevo para repetir la PCR. |
| c) Inversión de tubos de tiras y/o ID de muestra | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Repita la PCR. |
| d) Volumen de pipeteo posiblemente incorrecto | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Compruebe que se haya añadido un volumen de $5\text{ }\mu\text{l}$ de control/muestra y un volumen de $20\text{ }\mu\text{l}$ de mezcla maestra de qPCR. Realice una inspección visual de todos los volúmenes pipeteados. Compruebe las pipetas y vuelva a calibrarlas en caso necesario antes de repetir el paso de qPCR. |

Comentarios y sugerencias

Amplificación anticipada del control de mutación (MTC) (amplificación de FAM)

- | | |
|---|--|
| a) Volumen de pipeteo posiblemente incorrecto | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Compruebe que se haya añadido un volumen de 5 µl de control/muestra y un volumen de 20 µl de mezcla maestra de qPCR. Realice una inspección visual de todos los volúmenes pipeteados. Compruebe las pipetas y vuelva a calibrarlas en caso necesario antes de repetir el paso de qPCR. |
| b) Curva de amplificación posiblemente incorrecta | Revise la amplificación correspondiente en busca de curvas inusuales. Repita la PCR. |
| c) Inversión de tubos de tiras y/o ID de muestra | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Repita la PCR. |

Amplificación anticipada del control nativo (WTC) (amplificación de FAM)

- | | |
|---|--|
| a) Degradación de la mezcla de reacción | Almacene el contenido del kit entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantenga las mezclas de reacción protegidas de la luz. Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta) y, si es necesario, utilice un kit nuevo para repetir la PCR. |
|---|--|

Comentarios y sugerencias

- b) Volumen de pipeteo posiblemente incorrecto
- Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Compruebe que se haya añadido un volumen de 5 μl de control/muestra y un volumen de 20 μl de mezcla maestra de qPCR. Realice una inspección visual de todos los volúmenes pipeteados.
- Compruebe las pipetas y vuelva a calibrarlas en caso necesario antes de repetir el paso de qPCR.
- c) Inversión de tubos de tiras y/o ID de muestra
- Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Repita la PCR.
- d) Curva de amplificación posiblemente incorrecta
- Revise la amplificación correspondiente en busca de curvas inusuales.
- Repita la PCR.
- e) Contaminación por arrastre
- Sustituya todos los reactivos críticos.
- Repita el experimento con nuevas alícuotas de todos los reactivos.
- Manipule siempre las muestras, los componentes del kit y los fungibles según las prácticas recomendadas para evitar la contaminación por arrastre.
- Asegúrese de cambiar las puntas cada vez que pipetee reactivos distintos.

Comentarios y sugerencias

Amplificación anticipada del control nativo (WTC) (amplificación de FAM) y ninguna amplificación o amplificación baja del control de mutación (MTC) (amplificación de FAM)

- | | |
|--|---|
| a) Contaminación cruzada | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción y repita la PCR. |
| b) Inversión de las mezclas de reacción en los tubos o en la premezcla | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción y repita la PCR. |
| c) Inversión de tubos de tiras y/o ID de muestra | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Repita la PCR. |

Error del control nativo (WTC) frecuente debido a una amplificación del fondo alta por debajo de la diana de validez del ensayo (C_T)

Error del equipo Rotor-Gene Q MDx	Compruebe los registros de mantenimiento del equipo. Por ejemplo, una alineación incorrecta de la lente puede ocasionar una señal de fondo más alta. Si la alineación de la lente no forma parte de su plan de mantenimiento, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN para obtener más información y una posible intervención.
-----------------------------------	--

Error de la serie debido a una señal de fluorescencia inconsistente en controles y/o muestras (en todos los tubos)

Error de los accesorios del equipo Rotor-Gene Q MDx	Compruebe los registros de mantenimiento del equipo. El rotor de 72 pocillos puede ser defectuoso.
---	--

Si un problema no puede atribuirse a ninguna de las causas mencionadas en la “Guía de resolución de problemas” o si la medida correctora sugerida no permite resolver un problema, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN para recibir asistencia.

Control de calidad

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR ha sido probado con las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

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

Limitaciones

Este kit se ha diseñado para uso profesional.

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

Este kit debe utilizarse de acuerdo con las instrucciones recogidas en este manual, junto con un equipo validado especificado en el apartado "Materiales requeridos pero no suministrados" en la página 15.

Todos los reactivos suministrados con el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR se suministran para uso exclusivo con otros reactivos del mismo kit. El rendimiento podría verse afectado.

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

El kit *ipsogen* CALR RGQ PCR se ha validado únicamente para su uso con muestras de sangre total anticoagulada con EDTA 2K.

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

Únicamente se han validado Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (para PCR) y QIASymphony SP (para la preparación de muestras).

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

La interpretación de los resultados de diagnóstico obtenidos debe realizarse en combinación con otros resultados clínicos o de laboratorio. Si el estado de *CALR* de una muestra es “No Mutation Detected” (Mutación no detectada), hace referencia únicamente a la ausencia de una de las 36 mutaciones descritas en este manual (consulte Tabla 1) – dentro de los límites de la sensibilidad del kit – o a la falta de detección de mutaciones de tipo 23 y tipo 27 (consulte “Características de rendimiento/Especificidad” en la página 75). Esto no excluye la presencia de otras mutaciones en *CALR*.

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

Características de rendimiento

Límite de blanco

El límite de blanco (LOB) se ha determinado según el estándar CLSI/NCCLS EP-17-A2 (8) para muestras de sangre total de pacientes sanos y un estado *CALR* nativo (con 5 muestras, 60 mediciones por lote de reactivo y 2 lotes del kit *ipsogen CALR RGQ PCR*). El LOB de cada ensayo se determinó según el valor de LOB más bajo de los obtenidos.

Los resultados del LOB se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de los resultados del límite de blanco del kit *ipsogen CALR RGQ PCR*

Ensayo <i>CALR</i>	Límite de blanco
	(Valores C_T de FAM)
TYPE 1	35,24
TYPE 2	45,00
CLAMP 1	40,01
CLAMP 2	45,00
CLAMP 3	45,00
CLAMP 4	45,00
CLAMP 5	38,90

Límite de detección

El límite de detección (LOD) se ha determinado según el “enfoque Probit” descrito en el estándar CLSI/NCCLS EP-17-A2 (8). En este estudio se analizaron 5 niveles de mutación baja en 3 muestras independientes (ADNg extraído de un paciente positivo para la mutación *CALR* mezclado con ADN nativo). Se realizaron un total de 20 réplicas por dilución, por cada muestra positiva, para los ensayos TYPE 1 y TYPE 2 con 2 lotes del kit *ipsogen CALR RGQ PCR*.

El LOD de cada ensayo se determinó como el valor LOD más alto obtenido de los dos lotes examinados. Los resultados indican que la sensibilidad analítica de la mutación *CALR* de tipo 1 es del 0,60%, mientras que la sensibilidad analítica de la mutación *CALR* de tipo 2 es del 0,08% (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de los resultados del límite de detección del kit *ipsogen CALR RGQ PCR*

Ensayo <i>CALR</i>	Límite de detección
TYPE 1	0,60%
TYPE 2	0,08%

Introducción de ADN

Se evaluó la introducción de ADN_g optimizado para utilizar en combinación con el kit *ipsogen CALR RGQ PCR* mediante un lote de kit en 3 muestras positivas para *CALR* (plásmidos mezclados con ADN_g nativo) y una muestra negativa para *CALR* para 5 entradas de ADN_g distintas. En este estudio se realizaron 3 réplicas por muestra de entrada y ensayo *CALR*. Los resultados demuestran que la introducción óptima es de 50 ng (10 ng/ μ l).

Repetibilidad y reproducibilidad

El estudio de precisión se realizó conforme al estándar CLSI/NCCLS EP5-A2 (9). La precisión de cada ensayo *CALR* se valoró a partir de una mutación *CALR* específica, es decir, tipo 1 para los ensayos TYPE 1, CLAMP 1 y CLAMP 2, tipo 2 para los ensayos TYPE 2 y CLAMP 5 y tipo 28 para los ensayos CLAMP 3 y CLAMP 4. Se realizó el análisis para 3 niveles de mutación: 5%, 25% y 50% (plásmidos mezclados con ADN_g nativo). Se analizó cada nivel por duplicado mediante 49 series realizadas durante 20 días, con un mínimo de 73 mediciones por nivel de mutación y ensayo. Las 3 muestras generaron un coeficiente de variación para la precisión total (CV_{Total}) inferior al 5% para la mayoría de los ensayos (Tabla 7).

Nota: la precisión total de los ensayos CLAMP puede variar de una mutación CALR a otra.

Tabla 7. Resultados de repetibilidad y reproducibilidad del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR

Ensayo CALR	Nivel de mutación	N.º de mediciones	Sr*	Srr†	Total‡	CV _{Total} §
TYPE 1	50%	88	0,10	0,07	0,21	0,80
	25%	88	0,10	0,07	0,20	0,76
	5%	88	0,15	0,05	0,30	1,04
TYPE 2	50%	80	0,11	0,08	0,21	0,85
	25%	80	0,11	0,00	0,19	0,73
	5%	80	0,12	0,08	0,27	0,95
CLAMP 1	50%	106	0,14	0,13	0,27	1,05
	25%	105	0,13	0,28	0,50	1,90
	5%	106	0,20	0,37	0,55	1,92
CLAMP 2	50%	84	0,13	0,31	0,59	2,24
	25%	85	0,19	0,36	0,90	3,28
	5%	82	0,37	0,59	1,27	4,16
CLAMP 3	50%	84	0,49	0,52	2,33	8,04
	25%	84	0,73	0,70	3,54	11,26
	5%	84	1,28	3,18	5,70	15,03
CLAMP 4	50%	73	0,22	0,33	1,32	4,46
	25%	76	0,24	0,33	1,37	4,46
	5%	73	0,26	0,37	1,59	4,66
CLAMP 5	50%	100	0,17	0,17	0,66	2,52
	25%	100	0,21	0,05	0,75	2,73
	5%	104	0,39	0,55	0,94	3,04

* RE: repetibilidad expresada como desviación estándar.

† RES: reproducibilidad entre series expresada como desviación estándar.

‡ Precisión total (entre equipos, entre usuarios y entre lotes; expresada como desviación estándar).

§ coeficiente de variación para la precisión total.

Sustancias interferentes

El diseño del estudio se basó en recomendaciones descritas en el estándar EP07-A2 (10) del NCCLS. Se seleccionaron un total de 17 sustancias que pueden estar presentes en muestras de sangre por su posible efecto en la PCR: busulfán, hidrobromuro de citalopram, hemihidrato de hidrocloreto de paroxetina, hidrocloreto de sertralina, hidrocloreto de fluoxetina, acetaminofeno (paracetamol), bilirrubina no conjugada, EDTA de potasio, hemoglobina (humana), triglicéridos, lisinopril dihidrato, hidroxurea, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, tiotepa, anagrelida, interferón alfa-2b. También se valoró el posible efecto de una sustancia utilizada durante el proceso de extracción de ADNg (proteinasas K).

Los resultados demuestran que ninguna de las sustancias tuvo un efecto interferente.

Especificidad

La especificidad del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR se evaluó mediante el análisis de la capacidad del kit para identificar correctamente las mutaciones de tipo 1 y tipo 2 y para detectar las mutaciones en la Tabla 1.

En el caso de las mutaciones de tipo 1 y tipo 2, el estudio se realizó con muestras de ADNg extraídas de sangre total de pacientes con NMP Ph⁻ y unas concentraciones de mutación $\geq 16\%$ para el tipo 1 y $\geq 9\%$ para el tipo 2. Se confirmó la especificidad para el tipo 1 y el tipo 2: se detectaron todas las muestras y se identificaron correctamente.

La especificidad para las mutaciones de tipo 3 a tipo 36 se analizó mediante muestras de ADNg extraídas de sangre total de pacientes con NMP Ph⁻ disponibles (es decir, para los tipos 3, 4, 5, 24, 25, 27, 29). Para los casos de mutaciones poco comunes para los que no se pudo obtener ninguna muestra de paciente, la especificidad se valoró mediante material sintético como, por ejemplo, ADNg humano nativo mezclado con ADN plásmido portador de una mutación conocida de *CALR*, y con concentraciones clínicamente relevantes $> 10\%$ de la mutación (concentración media próxima al 30% de la mutación).

Los resultados muestran que todas las mutaciones *CALR* de tipo 3 a tipo 10, las más frecuentes, se detectan como mínimo con uno de los ensayos del kit *ipsogen CALR RGQ PCR*. La mayoría de las mutaciones *CALR* de tipo 11 a 36 (0,3% de ocurrencia) se detectan con al menos un ensayo del kit *ipsogen CALR RGQ PCR*. Solamente los tipos 23 y 27 no se pueden detectar con el kit, mientras que los tipos 22, 25, 26, 29 y 30 solo pueden detectarse en muestras con una elevada carga alélica de *CALR*.

Nota importante: el estudio de especificidad muestra que las mutaciones de tipo 5 y tipo 17 se detectan con el ensayo TYPE 1. El ensayo TYPE 2 permite la amplificación de las mutaciones de tipo 10, tipo 31 y tipo 33-36. Este es el comportamiento que se espera a partir de la elevada similitud entre estos tipos de mutación *CALR* (consulte la Tabla 1), a excepción de la mutación de tipo 17. Por lo tanto, el kit *ipsogen CALR RGQ PCR* no es capaz de diferenciar entre las mutaciones de tipo 1 y las de tipo 5/17, así como tampoco entre las mutaciones de tipo 2 y las de tipo 10/31/33-36. Actualmente no existe necesidad de diferenciar todas y cada una de las mutaciones del gen *CALR* para el diagnóstico o los tratamientos ya que la mayoría de las mutaciones *CALR* desencadenan la generación de proteínas *CALR* mutadas similares.

Validación clínica y comparación de métodos

La finalidad del estudio consiste en validar el kit *ipsogen CALR RGQ PCR* en condiciones de uso normal. El estudio valoró la capacidad del kit para identificar el tipo 1 y el tipo 2 de mutaciones *CALR* en una cohorte de muestras formada por pacientes sospechosos de NMP. El estudio de validación se realizó con muestras de ADN_g obtenidas de 227 pacientes sospechosos de padecer NMP (incluyendo muestras positivas para *CALR* y negativas para *CALR*).

Se comparó el estado de *CALR* de las muestras de ADN_g obtenidas con el kit *ipsogen CALR RGQ PCR* con el estado de *CALR* obtenido con un método de detección de mutación independiente basado en el análisis del tamaño de los fragmentos combinado con la secuenciación bidireccional Sanger. En los casos en los que se obtuvieron resultados discordantes se aplicó un tercer método de detección de mutación: la secuenciación masiva (NGS).

En la Tabla 8 se indica el estado *CALR* de todas las muestras utilizadas en este estudio según los métodos de referencia. La cohorte de muestras está formada por un 54,6% de muestras positivas y un 45,4% de muestras negativas. Entre las muestras positivas, un 42,7% pertenecían al tipo 1 y un 33,1% al tipo 2 de acuerdo con los métodos de referencia. Estas proporciones son coherentes con las descritas por Klampfl et al. (5), es decir, un 53% de tipo 1 y un 31,7% de tipo 2 (consulte la Tabla 1).

Tabla 8. Estado mutacional de *CALR* de la cohorte global de acuerdo con los métodos de referencia: análisis del tamaño de los fragmentos, secuenciación bidireccional Sanger y análisis NGS

Estado de <i>CALR</i>	Número
Mutación de tipo 1	53
Mutación de tipo 2	41
Tipo 1 y tipo 2	1
Otras mutaciones en <i>CALR</i>	29
Mutación positiva en <i>CALR</i>	124 (54,6%)
Mutación negativa en <i>CALR</i>	103 (45,4%)
Muestras totales	227

El kit *ipsogen CALR RGQ PCR* logró identificar correctamente todas las muestras de la cohorte caracterizadas con un estado mutacional en *CALR* de tipo 1 y/o tipo 2. El kit *ipsogen CALR RGQ PCR* asignó incorrectamente una mutación de tipo 1 a dos muestras: una caracterizada como de tipo 5 mediante los métodos de referencia y otra caracterizada como mutación no descrita en Klampfl et al. (5). De modo parecido, se asignó incorrectamente una mutación de tipo 2 a una muestra caracterizada por los métodos de referencia como mutación no descrita en Klampfl et al. (5). El análisis *in silico* demostró que estas muestras discordantes se deben probablemente a una similitud elevada de secuencias entre estas mutaciones y las mutaciones de tipo 1 o tipo 2.

Como consecuencia, la concordancia global entre resultados obtenida para las mutaciones de tipo 1 y tipo 2 combinada con el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR y el análisis de tamaño de los fragmentos/secuenciación Sanger/NGS es del 98,7% (intervalo de confianza [96,2%; 99,5%]). La sensibilidad y especificidad del kit *ipsogen* CALR RGQ PCR para las mutaciones en *CALR* de tipo 1 y tipo 2 combinadas son del 100% (intervalo de confianza [96,2%; 100%] y 97,7% [93,5%; 99,5%]) (Tabla 9).

Tabla 9. Resumen del resultado de rendimiento para las mutaciones en *CALR* de tipo 1 y tipo 2 combinadas

Variable	Estimación	Intervalo de confianza del 95%
Concordancia global	98,7%	[96,2%; 99,7%]
Sensibilidad	100%	[96,2%; 100%]
Especificidad	97,7%	[93,5%; 99,5%]

Referencias

1. James, C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
2. Levine, R.L., et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
3. Kralovics, R., et al. (2005) A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
4. Baxter, E.J., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
5. Klampfl, T., et al. (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2379.
6. Nangalia, J., et al. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2391.
7. Arber, D.A., et al. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP5-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). *Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP07-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Símbolos

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

Símbolo	Definición del símbolo
	Número de referencia
	Fabricante
	Número de material
Rn	“R” significa revisión del manual y “n” es el número de revisión
	Número de lote
	Número mundial de artículo comercial
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>

Símbolo	Definición del símbolo
	Marcado CE de conformidad europea
	Fecha de caducidad
	Contiene suficientes reactivos para N reacciones
	Limitación de temperatura
	Consultar las instrucciones de uso
	Mantener alejado de la luz solar

Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
<i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: control nativo de CALR, control de mutación de CALR, mezcla de reacción de TYPE 1 para CALR, mezcla de reacción de TYPE 2 para CALR, mezcla de reacción de CLAMP 1 para CALR, mezcla de reacción de CLAMP 2 para CALR, mezcla de reacción de CLAMP 3 para CALR, mezcla de reacción de CLAMP 4 para CALR, mezcla de reacción de CLAMP 5 para CALR, ADN polimerasa Taq, tampón TE para dilución y NTC	674023
Equipo Rotor-Gene Q MDx y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador HRM con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye 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 HRM con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033

Producto	Contenido	Referencia
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloque de aluminio para la configuración de reacción manual con pipeta de un solo canal en tubos de 72 x 0,1 ml	9018901
72-Well Rotor	Para almacenar tubos y tapones de tiras de 0,1 ml; requiere el anillo de fijación del rotor de 72 pocillos	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Para fijar tubos y tapones de tiras de 0,1 ml en el rotor de 72 pocillos	9018904
Rotor Holder	Soporte metálico independiente para el montaje de tubos y Rotor-Discs® en los rotores	9018908
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos y tapones para 1.000 reacciones	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapones para 10.000 reacciones	981106
QIASymphony SP y accesorios		
QIASymphony SP System	Módulo de preparación de muestras QIASymphony: incluye instalación y formación, así como 1 año de garantía en piezas y mano de obra	9001751
QIASymphony SP	Módulo de preparación de muestras QIASymphony: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Cartuchos para la preparación de muestras de 8 pocillos para su uso con QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Cubiertas para 8 barras para su uso con QIASymphony SP	997004

Producto	Contenido	Referencia
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Puntas con filtro desechables, en bandejas; (8 × 128). Para uso con QIAcube® y los equipos QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Puntas con filtro desechables, en bandejas; (8 × 128). Para uso con los equipos QIASymphony SP/AS	997024
Tube Insert 3b, 2 ml, v2, sample carrier, Qsym	Adaptador para tubos secundarios (para tubos con tapón de rosca de 2 ml) para uso con el transportador de tubos QIASymphony	9242083
Elution Microtubes CL (24 × 96)	Tubos de polipropileno no estériles (0,85 ml de capacidad máxima, menos de 0,7 ml de capacidad de almacenamiento, 0,4 ml de capacidad de elución); 2.304 en bandejas de 96; incluye tiras de tapones	19588
Productos relacionados		
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Para 50 extracciones: columnas QIAamp Mini Spin, tampones, reactivos, tubos, equipos VacConnectors	61104
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Para 192 preparaciones de 200 µl cada una: incluye 2 cartuchos de reactivos, gradillas para enzimas y accesorios.	937236
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7.000 unidades/ml, solución)	19101

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario 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 al servicio técnico 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 QIAGEN 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 QIAGEN 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 en CALR y los usos que se hagan de la misma están protegidos por derechos de patente, entre los que se incluyen la patente europea EP2808338 y sus equivalentes en otros países. La compra de este producto no confiere ningún derecho de empleo en ensayos clínicos de fármacos dirigidos a CALR. QIAGEN desarrolla programas de licencia específicos para tales usos. Póngase en contacto con QIAGEN Corporate Business Development a través de bd@qiagen.com.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony®, *ipsogen*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (Grupo QIAGEN); BHQ®, Black Hole Quencher® (LGC Biosearch); FAM™, HEX™, SYBR® (Life Technologies, Inc.); GenBank® (National Center for Biotechnology Information); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.).

Acuerdo de licencia limitada para el kit *ipsogen* CALR RGQ PCR

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con las Instrucciones de uso (Manual) 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 estas Instrucciones de uso (Manual) y en protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits 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 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 de los kits 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 al kit *ipsogen* CALR RGQ PCR y sus componentes.

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

HB-2198-002 1103549 157025473 04-2017

© 2016-2017 QIAGEN, reservados todos los derechos.

