

Noviembre 2017

Manual de uso del kit *therascreen*[®] PITX2 RGGQ PCR



Versión 1



Para uso diagnóstico in vitro

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

Para uso con el kit QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue

Para uso con el kit EpiTect[®] Fast DNA Bisulfite



873211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALEMANIA



R1 1107245ES



Índice

Uso previsto	5
Resumen y explicación	5
Principio del procedimiento	6
Materiales suministrados	12
Contenido del kit.....	12
Materiales requeridos pero no suministrados	12
Advertencias y precauciones.....	15
Información de seguridad.....	15
Precauciones generales.....	16
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	19
Condiciones de envío	19
Condiciones de almacenamiento.....	19
Estabilidad	19
Manipulación y almacenamiento de muestras	20
Procedimiento	21
Purificación y preparación del ADN genómico	21
Desparafinización de la sección FFPE con solución de desparafinización de QIAGEN	22
Purificación manual de ADNg con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.....	24
Cuantificación de ADN.....	29
Conversión por bisulfito de ADNg con el kit EpiTect Fast DNA Bisulfite.....	30

Protocolo: qPCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	38
Interpretación de los resultados	57
Análisis de los datos	57
Visualización de los resultados	61
Indicadores.....	63
Guía de resolución de problemas.....	68
Control de calidad.....	73
Limitaciones	73
Características de rendimiento	75
Límite de blanco.....	75
Límite de detección.....	76
Introducción de ADN.....	77
Linealidad	77
Repetibilidad y reproducibilidad	78
Sustancias interferentes	79
Contaminación cruzada.....	79
Periodo en uso	80
Validación clínica límite	80
Referencias	82
Símbolos	84
Información de contacto	85
Información para pedidos.....	86

Uso previsto

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR es una prueba de PCR in vitro, en tiempo real y específica de metilación concebida para la determinación de la relación porcentual de metilación (percent methylation ratio, PMR) en el promotor 2 del homeobox 2 de la pituitaria (PITX2). La prueba utiliza ADNg de conversión por bisulfito a partir de tejido FFPE obtenido de pacientes con cáncer de mama de alto riesgo. La PMR ayudará a los médicos a predecir la respuesta a la quimioterapia basada en antraciclina antineoplásica posquirúrgica, con o sin tratamiento endocrino, en pacientes con cáncer de mama negativos para HER2, positivos para receptores de estrógeno y positivos para ganglios linfáticos de alto riesgo.

Este producto está destinado a ser utilizado por usuarios cualificados, como técnicos y médicos que hayan recibido formación en técnicas de biología molecular y en procedimientos de diagnóstico in vitro.

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se utiliza con QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM Platform.

Resumen y explicación

El kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue se utiliza para la purificación de ADN procedente de tejido FFPE. El homeobox 2 de la pituitaria (PITX2) es un factor de transcripción inducido por la vía de señalización Wnt/ β -catenina. El PITX2 funciona como efector de la señalización Wnt mediante la obtención y la interacción con la β -catenina para aumentar la expresión de genes diana implicados en la proliferación celular, la migración, la progresión de tumores y la quimiosensibilidad (1-6). La actividad de la expresión génica del PITX2 se regula mediante metilación dentro de su región promotora mediante la llamada "modificación epigenética". Las moléculas pequeñas, denominadas "grupos metilo", se unen a la citosina base del ADN en la región promotora de un gen. La actividad de un gen de este tipo, completa o

parcialmente metilado, disminuye. En el cáncer de mama, se ha informado de que el PITX2 es un marcador pronóstico y predictivo para la respuesta a la quimioterapia endocrina o basada en antraciclina. Algunos estudios clínicos han mostrado una correlación estadística considerable entre la metilación en la región promotora del gen PITX2 y los valores de resultados clínicos como, por ejemplo, la supervivencia sin progresión, la supervivencia sin metástasis, la supervivencia sin enfermedad y la supervivencia general (7-12).

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR es un ensayo basado en PCR específico de metilación (qMSP) en tiempo real. El tipo de muestra es ADNbis, es decir, ADN genómico (ADNg) de conversión por bisulfito. El ADNg se purifica primero a partir de tejido incluido en parafina y fijado en formol (FFPE) de pacientes con cáncer de mama negativos para HER2, positivos para receptores de estrógeno y positivos para ganglios linfáticos de alto riesgo. Tras la exposición a bisulfito para distinguir entre PITX2 metilado y no metilado, la relación porcentual de metilación (PMR) de tres motivos CpG del promotor 2 del gen PITX2 se cuantifica mediante qMSP y se calcula con el software Rotor-Gene AssayManager® con el complemento Gamma y el perfil de ensayo de PITX2. La PMR obtenida proporcionará información al médico encargado del tratamiento acerca de la probabilidad de que el paciente responda a la quimioterapia basada en antraciclina. Si la PMR obtenida es igual o inferior a 12, es probable que el paciente responda a la quimioterapia basada en antraciclina. Por el contrario, si la PMR obtenida es superior a 12, se puede proponer un tratamiento alternativo, ya que existe una probabilidad menor de que el paciente responda a la quimioterapia basada en antraciclina. (consulte "Validación clínica límite", página 80).

Principio del procedimiento

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR utiliza PCR en tiempo real (PCRq) para determinar la relación porcentual de metilación (PMR) en el promotor 2 del PITX2. El tipo de muestra para el kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR es ADNg de conversión por bisulfito. Esta conversión por bisulfito se realiza usando el kit EpiTect Fast DNA Bisulfite (QIAGEN, n.º de referencia 59824 o 59826). El ADNg empleado para esta conversión se purifica a partir de tejido FFPE de

pacientes con cáncer de mama de alto riesgo con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n.º de referencia 60404). El flujo de trabajo se muestra en la Figura 1.

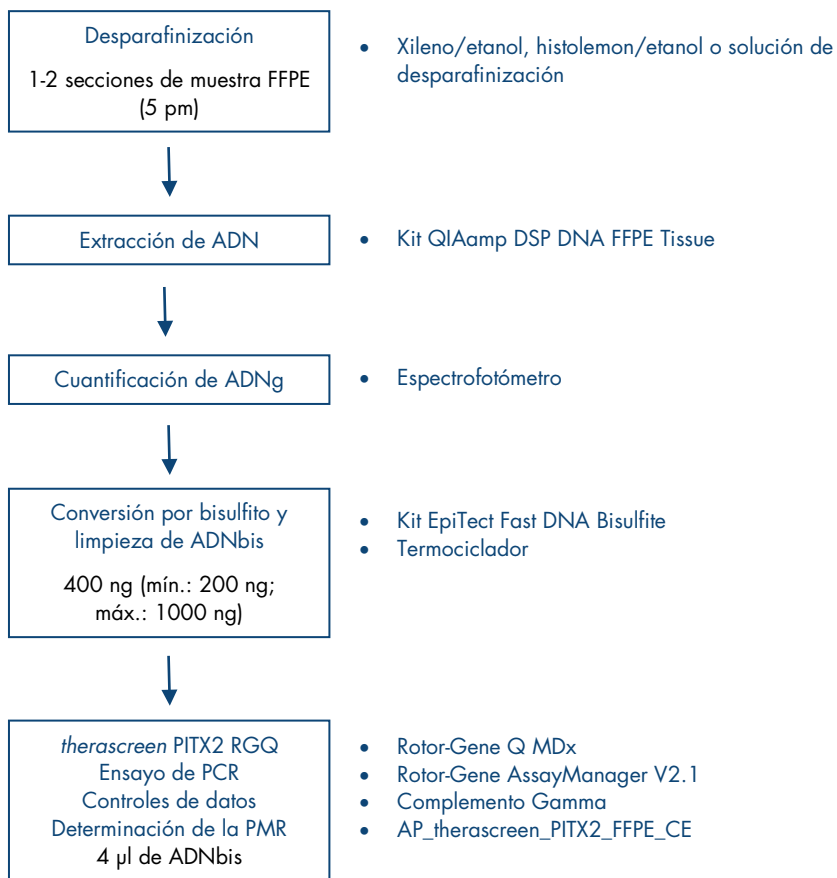


Figura 1. Flujo de trabajo del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR.

El uso de qPCR permite la detección exacta de una secuencia de ADNbis específica durante la fase exponencial del proceso de amplificación. Los datos de qPCR se pueden obtener con rapidez, sin procesamiento posterior a la PCR, mediante la detección en tiempo real de señales fluorescentes durante el ciclado de PCR.

El ensayo del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR aprovecha el principio de hidrólisis de oligonucleótidos de qPCR de las sondas TaqMan®, en combinación con cebadores no específicos de metilación (Figura 2, página siguiente). Este ensayo utiliza un par de cebadores que amplifican todas las secuencias diana de conversión por bisulfito. Se obtienen dos señales distintas con esta amplificación mediante el uso de dos sondas TaqMan marcadas con dos fluoróforos distintos. Estas sondas, formadas por oligonucleótidos marcados con un fluoróforo indicador en el extremo 5' (FAM™ o HEX™) y un fluoróforo supresor en sentido descendente en el extremo 3', se hibridan con secuencias diana dentro del producto de la PCR. Una sonda es específica de las secuencias de ADNbis de secuencias metiladas, teñidas con FAM. La otra es específica de las secuencias de ADNbis de secuencias no metiladas, teñidas con HEX. El análisis mediante qPCR de TaqMan aprovecha 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 cebador 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 3, página 11). 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. Este proceso tiene lugar en cada ciclo y no interfiere en la acumulación exponencial del producto (Figura 3, página 11). El aumento de la señal de fluorescencia se detecta únicamente si la secuencia diana es complementaria a los cebadores y la sonda y, por consiguiente, se amplifica durante la PCR. El valor de C_T es el ciclo de PCR en el que la fluorescencia de una determinada reacción cruza los valores umbral predefinidos (determinados con el software *therascreen* PITX2 Assay Package).

Los resultados del ensayo del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR son dos valores C_T uno para FAM y uno para HEX. Se calcula una PMR a partir del valor ΔC_T entre ambas señales (Figura 2, siguiente página). El cálculo de la PMR se basa en la siguiente fórmula (11):

$$PMR = \frac{100}{1 + 2^{C_{T,FAM} - C_{T,HEX}}}$$

La PMR obtenida proporcionará información al médico encargado del tratamiento acerca de la probabilidad de que el paciente responda a la quimioterapia basada en antraciclina. Si la PMR obtenida es igual o inferior a 12, es probable que el paciente responda a la quimioterapia basada en antraciclina. Por el contrario, si la PMR obtenida es superior a 12, se puede proponer un tratamiento alternativo, ya que existe una probabilidad menor de que el paciente responda a la quimioterapia basada en antraciclina.

El tiempo necesario para realizar todas las tareas, desde la purificación de ADNg hasta el análisis de los datos, es inferior a dos días de trabajo.

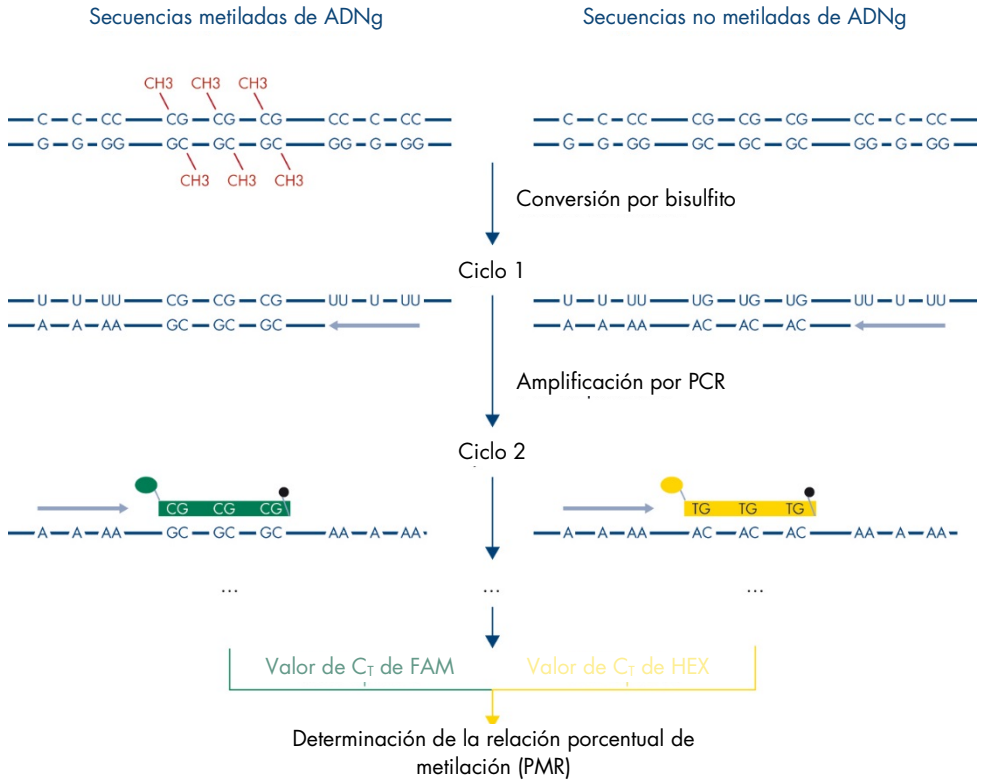


Figura 2. Principio del ensayo del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR.

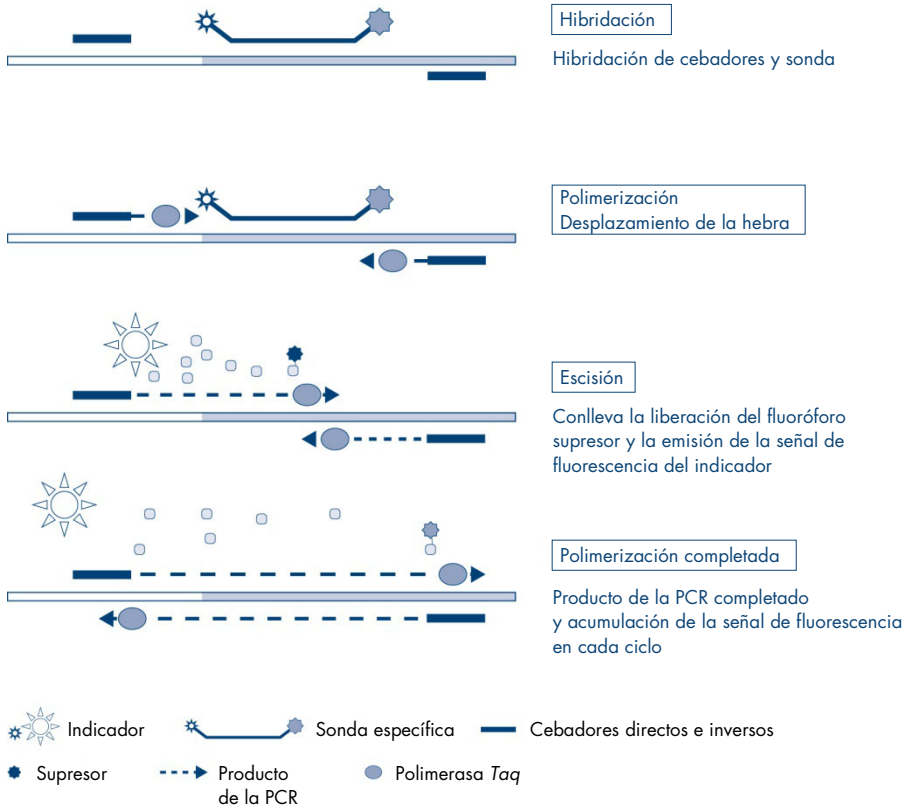


Figura 3. Principio del ensayo de PCR en tiempo real de TaqMan.

Materiales suministrados

Contenido del kit

<i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit		(8)
N.º de referencia		873211
Número de reacciones		8
Púrpura	PITX2 RGQ PCR Mater mix (Mezcla maestra para PITX2 RGQ PCR)	660 µl
Azul	PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix (Mezcla de sonda de cebadores para PITX2 RGQ PCR)	192 µl
Amarillo	PITX2 RGQ PCR Reference 50 (Referencia 50 de PITX2 RGQ PCR)	12 µl
Naranja	PITX2 RGQ PCR Reference Low (Referencia baja de PITX2 RGQ PCR)	12 µl
Verde	PITX2 RGQ PCR Negative Control (Control negativo de PITX2 RGQ PCR)	12 µl
Incoloro	PITX2 RGQ PCR NTC (NTC de PITX2 RGQ PCR)	12 µl
–	Instructions for Use (Handbook) (Instrucciones de uso (manual))	1

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 (safety data sheets, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante. Asegúrese de que todos los reactivos de los kits no hayan caducado y se hayan transportado y almacenado en las condiciones adecuadas.

Reactivos

- Etanol (calidad molecular 96 %-100 %)

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

Equipo

- Termomezclador, incubador orbital térmico, bloque térmico o baño de agua que permita la incubación a 56 °C y 90 °C.

Nota: Tenga en cuenta los requisitos de forma de tubo del termomezclador para seleccionar el tamaño de tubo adecuado (p. ej., tubos de 2 ml o 1,5 ml)

- Pipetas ajustables* específicas para PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
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 manipulación de ADNbis y controles, incluida la carga del molde de PCR.
- Puntas de pipeta de PCR sin nucleasa, resistentes a aerosoles y estériles con filtros hidrófobos (se recomiendan puntas de pipeta con barreras de aerosol para evitar la contaminación cruzada).
- 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (Tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml o 2 ml) (tubos de 1,5 ml, disponibles en Eppendorf, n.º de referencia 0030120.086, o en Sarstedt, n.º de referencia 72.690)
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 0,5 ml, 1,5 ml y 2,0 ml (capaz de alcanzar 20 000 x g)

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

- Agitador vorticial
- Espectrofotómetro, p. ej. equipo NanoDrop® o QIAxpert® (complemento QIAamp: medición de ácido nucleico total)*
- Guantes desechables

Reactivos opcionales para control de flujo de trabajo

- One vial containing one section (15 or 20µm) of KRAS G13D Reference Standard (Un vial que contiene una sección (15 o 20 µm) de estándar de referencia KRAS G13D) (Horizon Discovery, n.º de referencia HD216).

Para purificación manual del ADN

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue) (n.º de referencia 60404)
- Deparaffinization Solution (Solución de desparafinización) (n.º de referencia 19093), xileno o histolemon (Carlo Erba, n.º de referencia 454911)

Importante: La solución de desparafinización, xileno o histolemon no se suministra con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue y debe solicitarse por separado.

Adicional para conversión por bisulfito

- EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Kit EpiTect Fast DNA Bisulfite) (n.º de referencia 59824 o 59826)
- Tubos de reacción de 0,2 ml o tiras de 8 pocillos
- Microcentrifugadora para tubos de 0,2 ml
- Termociclador con tapa térmica (ya que la reacción de bisulfito no se superpone con aceite mineral, solo los cicladores térmicos con tapas térmicas son adecuados para este procedimiento)

* Esta no es una lista de proveedores completa.

Para PCR en 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 Gamma, versión 1.0.x (x = 0 o superior) para Rotor-Gene AssayManager v2.1
- Perfil de ensayo de *therascreen_PITX2_FFPE_CE* V1.0.x (x = 1 o superior)
- Loading Block for 72x 0.1 ml Tubes (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, for the Rotor-Gene Q MDX (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 diagnóstico in vitro

Información de seguridad

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 (safety data sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety donde también podrá encontrar, consultar e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN®.

Para obtener información de seguridad sobre la solución de desparafinización, xileno-etanol, histolemon-etanol, el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue o el kit EpiTect Fast DNA Bisulfite, consulte los manuales correspondientes. Para conocer la información de seguridad relativa a los equipos, consulte el manual de usuario de cada instrumento.

Precauciones generales

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 *therascreen* PITX2 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 o superiores a 20 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.
- Todo el flujo de trabajo de *therascreen* PITX2 requiere la transferencia de muestras en tubos distintos. De este modo, se garantiza que la trazabilidad de las muestras se mantiene adecuadamente en cada paso.
- Asegúrese de que están instalados el perfil de ensayo de PITX2 y el complemento Gamma de Rotor-Gene AssayManager v2.1 necesario.

- 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.
- Descongele todos los componentes de *therascreen* PITX2 RGQ PCR y las muestras en un refrigerador, en hielo, en un bloque de enfriamiento o a temperatura ambiente durante el tiempo que sea necesario.

Nota: Si la descongelación se realiza a temperatura ambiente, compruebe con regularidad si el material se ha descongelado, especialmente la mezcla maestra (MMx) de PITX2 RGQ PCR, ya que contiene dNTP que son sensibles a la temperatura.

Nota: PITX2 RGQ PCR PPM se debe proteger de la luz, ya que contiene nucleótidos de fluoróforo.

Nota: Se debe evitar la descongelación y la congelación repetidas y no se debe superar un máximo de cuatro ciclos de congelación-descongelación.

- 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.
- No se trague ningún reactivo.
- Utilice pipetas individuales exclusivas para preparar la mezcla 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.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación de la mezcla de reacción con los materiales contenidos en los reactivos de control de referencia 50 de PITX2 RGQ PCR y de referencia baja de PITX2 RGQ PCR.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación por arrastre de ADN o de productos de la PCR, ya que podría generar una señal positiva falsa.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación por DNasa, que podría degradar el molde de ADN.

Por lo tanto, recomendamos lo siguiente:

- Utilizar material de laboratorio (como pipetas, puntas de pipeta, tubos de reacción) libre de nucleasas y llevar guantes desechables 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 mezcla de reacción 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 la misma zona, añada NTC de PITX2 RGQ PCR al tubo adecuado (Figura 4, página 41), pero cierre este tubo después de cargar todos los demás controles y muestras para evaluar la contaminación cruzada. Añada muestras para su análisis: referencia 50 de PITX2 RGQ PCR, referencia baja de PITX2 RGQ PCR y control negativo de PITX2 RGQ PCR en una sala aparte con material específico (pipetas, puntas, etc.).

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Condiciones de envío

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se suministra en hielo seco. Si alguno de los componentes del kit *therascreen* PITX2 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).

Condiciones de almacenamiento

Tras recibirlo, debe almacenar el kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR inmediatamente en un congelador a una temperatura constante entre -30 °C y -15 °C y protegerlo de la luz.

Para obtener información de almacenamiento y manipulación sobre la solución de desparafinización, xileno-etanol, histolemon-etanol, el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue o el kit EpiTect Fast DNA Bisulfite, consulte los manuales correspondientes.

Estabilidad

Si se almacena en las condiciones especificadas, el kit *therascreen* PITX2 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. Se debe evitar la descongelación y la congelación repetidas y no se debe superar un máximo de cuatro ciclos de congelación-descongelación.

Para obtener información de estabilidad sobre la solución de desparafinización, xileno-etanol, histolemon-etanol, el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue o el kit EpiTect Fast DNA Bisulfite, consulte los manuales 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

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR debe usarse con muestras de ADNbis. El ADN purificado y de conversión por bisulfito procede de tejido tumoral FFPE, obtenido de lesiones primarias de pacientes con cáncer de mama negativos para HER2, positivos para receptores de estrógeno y positivos para ganglios linfáticos de alto riesgo. Fije las muestras de tejidos en formalina según el protocolo del laboratorio (generalmente se acepta formalina neutra tamponada al 10 %) lo antes posible tras la escisión quirúrgica.

- La muestra de tejido se debe fijar en formalina al 4 %-10 % tan rápido como sea posible después de la extracción quirúrgica o la biopsia central.
- Lo mejor es aplicar un tiempo de fijación de 14 a 24 horas (los tiempos de fijación superiores producen una fragmentación más intensa del ADN, provocando un rendimiento deficiente en los ensayos de qPCR/qMSP).
- Deshidrate las muestras meticulosamente antes de incorporarlas (los restos de formalina pueden inhibir la digestión por la proteinasa K).
- Las secciones de 5 μm de grosor se deben cortar del bloque de parafina.
- Para las secciones que tienen un área tumoral $<100 \text{ mm}^2$, se recomienda procesar dos secciones para aumentar el área tumoral total hasta al menos 100 mm^2 .
- Etiquete, manipule y almacene las muestras tumorales, bloques, secciones y muestras listos para la purificación de una forma controlada según los procedimientos locales.

- Conserve y almacena las secciones y los bloques FFPE a temperatura ambiente. Las secciones se pueden usar rápidamente para la purificación del ADN.
- El ADN purificado con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue se puede almacenar entre 2 °C y 8 °C para un almacenamiento a corto plazo de hasta 24 horas, o bien entre -30 °C y -15 °C si se necesita almacenarlo a largo plazo.
- El ADN de conversión por bisulfito obtenido empleando el kit EpiTect Fast DNA Bisulfite se puede almacenar entre -30 °C y -15 °C durante al menos 9 meses sin que su calidad o conversión disminuyan. Existen otras investigaciones sobre el almacenamiento a largo plazo que están en proceso. Póngase en contacto con QIAGEN para obtener más información.
- La sección del estándar de referencia KRAS G13D de control de flujo de trabajo (Horizon Discovery, n.º de referencia HD216) se puede almacenar a temperatura ambiente durante 36 meses a partir de la fecha de fabricación.

Procedimiento

Purificación y preparación del ADN genómico

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se ha validado en combinación con la solución de desparafinización QIAGEN (n.º de referencia 19093) para desparafinización de sección FFPE, el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n.º de referencia 60404) para purificación de ADNg y el kit EpiTect Fast DNA Bisulfite (n.º de referencia 59824 o 59826) para la conversión por bisulfito del ADNg.

La desparafinización de la sección FFPE se puede realizar usando solución de desparafinización, xileno-etanol o histolemon-etanol (la equivalencia de estos tres métodos de desparafinización se ha demostrado durante el desarrollo del producto).

Si se utiliza la solución de desparafinización (n.º de referencia 19093), empiece por el procedimiento "Desparafinización de la sección FFPE con solución de desparafinización de QIAGEN" página 22.

Si se utiliza xileno-etanol o histolemon-etanol, pase directamente al procedimiento, "Purificación manual de ADNg con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue" en la página 24.

Opcional: para determinar si la purificación y la conversión por bisulfito se han realizado correctamente, se puede usar un control de flujo de trabajo. El control de flujo de trabajo validado para el flujo de trabajo del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR es la sección del estándar de referencia KRAS G13D (Horizon Discovery, n.º de catálogo HD216).

Asegúrese de que los reactivos para la purificación del ADNg no han caducado y se han transportado y almacenado en las condiciones adecuadas. No utilice componentes caducados o mal almacenados.

Material inicial

El material inicial para la purificación del ADN debe consistir en secciones recién cortadas de tejido FFPE. Se puede conservar toda la noche a temperatura ambiente si es necesario. Se debe usar un máximo de dos secciones, cada una con un grosor de 5 µm y un área de superficie total superior a 100 mm², como material inicial para la purificación del ADNg.

Desparafinización de la sección FFPE con solución de desparafinización de QIAGEN

IMPORTANTE: Si la desparafinización se realiza con xileno-etanol o histolemon-etanol, continúe con "Purificación manual de ADNg con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue" en la página 24.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Realice todos los pasos de la centrifugación a temperatura ambiente (15-25 °C).
- Equilibre todos los tampones a temperatura ambiente; equilibre la solución de desparafinización entre 20 °C y 25 °C.
- La solución de desparafinización no se suministra con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue y debe solicitarse por separado.

Antes de comenzar

- Ajuste un termomezclador o un incubador orbital térmico a 56 °C para su uso en los pasos 4 y 8. Si no dispone de un termomezclador o un incubador orbital térmico, puede utilizar en su lugar un bloque térmico o un baño de agua.
- Si los tampones AL o ATL contienen precipitados, disuélvalos mediante calentamiento a 70 °C y agitando con suavidad.
- Asegúrese de que los tampones AW1 y AW2 se han preparado siguiendo las instrucciones del manual del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook (*kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue*).

Procedimiento (para un máximo de dos secciones)

1. Recorte con un bisturí la parafina sobrante del bloque de muestra. Realice cortes en secciones de 5 µm de grosor.
Nota: Si la superficie de la muestra ha estado expuesta al aire, elimine los primeros 2 a 3 cortes.
2. Coloque inmediatamente las secciones en un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml o 2 ml (no suministrado).
3. Añada 160 µl de solución de desparafinización y agite con fuerza durante 10 segundos. Centrifugue brevemente para que la muestra se deposite en el fondo del tubo.
4. Incube la muestra a 56 °C durante 3 minutos y, a continuación, permita que se enfríe a temperatura ambiente (15 °C-25 °C).

5. Añada 180 µl de tampón ATL y mezcle mediante agitación vorticial.
6. Centrifugue durante 1 minuto a 11 000 x g (10 000 rpm). Aparecen dos fases (azul y transparente).
7. Añada 20 µl de proteinasa K a la fase inferior y transparente presionando la pipeta a través de la fase superior. Mezcle suavemente pipeteando arriba y abajo.
8. Incube a 56 °C ± 3 °C durante ≥1 hora (o hasta que la muestra se haya lisado completamente).
9. Incube a 90 °C ± 5 °C durante 1 hora ± 5 minutos.

La incubación a 90°C en tampón ATL invierte parcialmente la alteración de los ácidos nucleicos por el formaldehído. Los tiempos de incubación más largos o las temperaturas de incubación mayores pueden provocar una fragmentación más intensa del ADN.

Nota: Si emplea un único bloque calefactor, deje la muestra a temperatura ambiente (15 °C-25 °C) tras la incubación a 56 °C del paso 8 hasta que el bloque calefactor haya alcanzado los 90 °C del paso 9.

10. Centrifugue brevemente el tubo de 1,5 ml para eliminar las gotas del interior de la tapa.
11. Transfiera la fase inferior y transparente a un nuevo tubo de microcentrifugadora de 2 ml (no suministrado).

Nota: No transfiera ninguna fase azul.

12. Continúe con el paso 14 de "Purificación manual de ADNg con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue" en la página 24.

Purificación manual de ADNg con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

La purificación manual de ADNg se realiza con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n.º de referencia 60404) según el manual del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (*QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook*).

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Realice todos los pasos de la centrifugación a temperatura ambiente (15-25 °C).

Antes de comenzar

- Equilibre todos los tampones a temperatura ambiente.
- Ajuste un termomezclador o un incubador orbital térmico a 56 °C para su uso en el paso 12.
- Si no dispone de un termomezclador o un incubador orbital térmico, puede utilizar en su lugar un bloque térmico o un baño de agua.
- Si las soluciones tampón AL o ATL contienen precipitados, disuélvalos mediante calentamiento a 70 °C y agitando con suavidad.
- Asegúrese de que los tampones AW1 y AW2 se han preparado siguiendo las instrucciones del manual del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (*QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook*).

Procedimiento

Nota: Si se utiliza solución de desparafinización QIAGEN, los pasos del 1 al 14 se deben sustituir mediante el procedimiento descrito en "Desparafinización de la sección FFPE con solución de desparafinización de QIAGEN", en la página 22.

1. Recorte con un bisturí la parafina sobrante del bloque de muestra.
2. Corte de 1 a 2 secciones de 5 µm de grosor para alcanzar al menos 100 mm² de superficie tumoral (consulte "Material inicial", página 22).
Si la superficie de la muestra ha estado expuesta al aire, elimine los primeros 2 a 3 cortes.
3. Coloque inmediatamente las secciones en un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml o 2 ml (no suministrado).
4. Añada 1 ml de xileno o histolemon a la muestra. Cierre la tapa y mezcle con fuerza mediante agitación vorticial durante ≥10 segundos.
5. Centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos ± 30 segundos a temperatura ambiente.
6. Elimine el sobrenadante mediante pipeteado. No elimine ninguna parte del sedimento.

7. Añada 1 ml de etanol (96 %-100 %) al sedimento y mezcle mediante agitación vorticial.
El etanol extrae el xileno residual de la muestra.
8. Centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos \pm 30 segundos a temperatura ambiente.
9. Elimine el sobrenadante mediante pipeteado. No elimine ninguna parte del sedimento.
Elimine con cuidado cualquier resto de etanol con una punta de pipeta fina.
10. Abra el tubo e incúbelo a una temperatura entre 15 °C y 40 °C. Incúbelo durante 10 minutos \pm 1 minuto o hasta que se haya evaporado todo el etanol residual.
11. Resuspenda el sedimento en 180 μ l de tampón ATL. Añada 20 μ l de proteinasa K y mezcle mediante agitación vorticial.
12. Incube a 56 °C \pm 3 °C durante \geq 1 hora (o hasta que la muestra se haya lisado completamente).
13. Incube a 90 °C \pm 5 °C durante 1 hora \pm 5 minutos.

La incubación a 90°C en tampón ATL invierte parcialmente la alteración de los ácidos nucleicos por el formaldehído. Los tiempos de incubación más largos o las temperaturas de incubación mayores pueden provocar una fragmentación más intensa del ADN. Si emplea un único bloque calefactor, deje la muestra a temperatura ambiente tras la incubación a 56 °C hasta que el bloque calefactor haya alcanzado los 90 °C.

14. Centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.

Nota: Si se utiliza solución de desparafinización, continúe con el paso 15.

15. Añada a la muestra 200 μ l de tampón AL y mezcle a fondo mediante agitación vorticial. A continuación, añada 200 μ l de etanol (96 %-100 %) y mezcle de nuevo a fondo mediante agitación vorticial.

Es esencial que la muestra, el tampón AL y el etanol se mezclen inmediatamente y a fondo mediante agitación vorticial o pipeteando hasta conseguir una solución homogénea. El tampón AL y el etanol pueden mezclarse previamente y añadirse juntos en un solo paso para ahorrar tiempo cuando se procesan varias muestras. Es posible que se forme un precipitado blanco al añadir el tampón AL y el etanol. Este precipitado no interfiere con el procedimiento QIAamp.

16. Centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
17. Transfiera cuidadosamente el lisado completo a la columna QIAamp MinElute® (en un tubo de recogida de 2 ml) sin mojar el borde, cierre la tapa y centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 minuto. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un tubo de recogida limpio de 2 ml (proporcionado) y deseche el tubo de recogida que contiene el líquido.
- Si el lisado todavía no ha atravesado completamente la membrana tras el centrifugado, repita el centrifugado a una velocidad mayor hasta que la columna QIAamp MinElute quede vacía.
18. Abra con cuidado la columna QIAamp MinElute y añada 500 μ l de tampón AW1 sin mojar el borde. Cierre el tapón y centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 minuto. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un tubo de recogida limpio de 2 ml (proporcionado) y deseche el tubo de recogida que contiene el líquido.
19. Abra con cuidado la columna QIAamp MinElute y añada 500 μ l de tampón AW2 sin mojar el borde. Cierre el tapón y centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 minuto. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un tubo de recogida limpio de 2 ml (proporcionado) y deseche el tubo de recogida que contiene el líquido.
- Debe evitarse el contacto entre la columna QIAamp MinElute y el líquido. Algunos rotores de centrifugadora pueden vibrar durante la deceleración y hacer que el líquido que contiene etanol entre en contacto con la columna QIAamp MinElute. Tenga cuidado al retirar la columna QIAamp MinElute y el tubo de recogida del rotor, de modo que el líquido no entre en contacto con la columna QIAamp MinElute.
20. Centrifugue a velocidad máxima (aproximadamente 20 000 x g) durante ≥ 3 minutos para secar completamente la membrana.
- Este paso es necesario, ya que el arrastre de etanol hacia el eluato puede inhibir las reacciones de qPCR realizadas.

21. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un tubo de microcentrifugadora limpio de 1,5 ml (proporcionado) y deseche el tubo de recogida que contiene el líquido. Abra con cuidado la tapa de la columna QIAamp MinElute y aplique 50 µl de tampón ATE en el centro de la membrana.
22. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente (15 °C-25 °C) durante 5 minutos.
Centrifugue a velocidad máxima (aproximadamente 20 000 x g) durante ≥ 1 minuto.

Cuantificación de ADN

El tampón ATE utilizado para la elución en los kits de purificación de ADN_g contiene 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 con tampón ATE para calibrar el espectrofotómetro.

La concentración de ADN se determina mediante la medición de la absorbancia a 260 nm después del procedimiento con el equipo utilizando QIAxpert de QIAGEN, por ejemplo (complemento QIAamp: medición de ácido nucleico total) o un equipo NanoDrop*. 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 corresponde a 50 µg de ADN por mililitro ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$). Cantidad total de ADN purificado (ng) = concentración de ADN (ng/µl) x volumen de la muestra (µl).

Nota: Si se utiliza el complemento QIAamp, se resta automáticamente un espectro de blanco de ATE de los calores OD, por lo que no es necesaria una muestra de ATE de blanco adicional con esta configuración.

* Esta no es una lista completa de los espectrofotómetros posibles para la medición de OD₂₆₀ nm.

De manera ideal, una concentración mínima de ADNg es 10 ng/μl*, pero pueden procesarse muestras de 5 ng/μl con el riesgo de obtener resultados no válidos de "Low input" (entrada baja).

Conversión por bisulfito de ADNg con el kit EpiTect Fast DNA Bisulfite

Este protocolo permite la conversión por bisulfito de cantidades de ADN de 200, 400 y hasta 1000 ng (medido empleando una medición de OD₂₆₀ nm) en un volumen de hasta 40 μl. La entrada de ADN recomendada por reacción de conversión por bisulfito es de 400 ng. Sin embargo, en caso de un rendimiento bajo de ADN, se pueden usar entradas de ADN de 200 ng y, en caso de repetición de pruebas debida a un indicador de "entrada baja" en el análisis de qPCR (consulte "Indicadores", página 63), se deben usar 1000 ng o una cantidad tan cercana a esta como sea posible.

Nota: La entrada de ADNg se refiere a una cuantificación de ADNg con medición de OD 260 (p. ej., empleando un equipo NanoDrop o QIAxpert con el complemento QIAamp para la medición de ácido nucleico total).

Material inicial

- El ADN genómico se debe usar para el tratamiento de bisulfito sin ningún paso de digestión de restricción anterior.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Asegúrese de que los reactivos de conversión por bisulfito no han caducado y se han transportado y almacenado en las condiciones adecuadas. No utilice componentes caducados o mal almacenados.

* 10 ng/μl para obtener 400 ng de entrada de ADNg (entrada recomendada) para conversión por bisulfito, ya que el volumen máximo de ADNg para conversión es 40 μl.

- El tampón protector de ADN debe pasar de verde a azul tras añadir la mezcla de solución de bisulfito de ADN, lo que indica que se ha mezclado lo suficiente y que el pH es correcto para la reacción de conversión de bisulfito. Un pH incorrecto podría afectar a la fijación del ADN convertido en la columna.
- Realice todos los pasos de la centrifugación a temperatura ambiente (15-25 °C).
- La solución de bisulfito se puede almacenar a temperatura ambiente (15-25 °C) durante al menos 6 meses.
- Puede que se formen precipitados de color blanco en la mezcla de etanol/tampón BD tras algún tiempo de almacenamiento. Estos precipitados no afectarán al rendimiento del tampón BD. No obstante, evite transferir precipitados a la columna de centrifugado de ADN MinElute.

Antes de comenzar

- Prepare los reactivos del kit como se describe en la sección "Preparación de reactivos" del EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbook (*manual de conversión por bisulfito rápida EpiTect*).
- Equilibre las muestras y tampones a temperatura ambiente.
- **Opcional:** establezca un termomezclador, un bloque térmico o un incubador orbital térmico a 60 °C para disolver la solución de bisulfito.

Manipulación de las columnas de centrifugación de ADN MinElute

Dada la sensibilidad de las tecnologías de amplificación de los ácidos nucleicos, cuando se manipulen las columnas de centrifugación de ADN MinElute deben adoptarse las siguientes medidas de precaución con el fin de evitar una posible contaminación cruzada entre las preparaciones de muestras:

- Pipetee la muestra o la solución en la columna de centrifugación de ADN MinElute sin mojar el borde de la columna. Evite tocar la membrana de la columna de centrifugación de ADN MinElute con la punta de pipeta.
- Cambie siempre las puntas de pipeta entre las transferencias de líquidos. Recomendamos el uso de puntas de pipeta resistentes a aerosoles.
- Abra cada vez solamente una columna de centrifugación de ADN MinElute y tenga cuidado para no generar aerosoles.
- Use guantes durante todo el procedimiento. Si los guantes entran en contacto con la muestra, cámbieselos inmediatamente.

Centrifugado

- Las columnas de centrifugación de ADN MinElute se pueden utilizar en la mayoría de tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml-2 ml convencionales. Se suministra un conjunto de tubos de recogida de 2 ml para el paso de centrifugado en seco.
- Todos los pasos de centrifugado deben realizarse a temperatura ambiente (15-25 °C).
- Procese las columnas de centrifugación de ADN MinElute en una microcentrifugadora.
- Cierre siempre las columnas de centrifugación de ADN MinElute antes de introducir las en la microcentrifugadora.
- Para llevar a cabo un procesamiento paralelo eficaz de varias muestras, recomendamos llenar una gradilla con tubos de recogida a los que se pueden transferir las columnas de centrifugación de ADN MinElute después del centrifugado. Los tubos de recogida pueden utilizarse varias veces.

Procedimiento

1. Descongele ADN para su uso en las reacciones de conversión por bisulfito. Asegúrese de que la solución de bisulfito se ha disuelto por completo.

Nota: Si es necesario, caliente la solución de bisulfito a 60 °C y mézclela mediante agitación vorticial hasta que todos los precipitados se hayan disuelto de nuevo.

Nota: No coloque solución de bisulfito disuelta en hielo.

2. Prepare las reacciones de bisulfito en tubos para PCR de 200 µl (no suministrados) según la Tabla 1, en la página siguiente. Añada cada componente en el orden que aparece en la lista.

Nota: El volumen combinado de ADN y agua libre de RNasa debe ser un total de 40 µl.

Nota: Para determinar el volumen adecuado de entrada de ADNg de interés, use la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de ADNg necesario para una conversión por bisulfito } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Entrada de interés (ng)}}{\text{Concentración de ADNg promedio (ng}/\mu\text{l)}}$$

Nota: Cuando se usa el kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR, el protocolo de "concentración baja" del *manual de conversión por bisulfito rápida EpiTect* debe usarse siempre, incluso con la entrada de 1000 ng, ya que la concentración de ADNg purificado de muestras FFPE suele ser baja.

Nota: La mezcla de bisulfito debe mezclarse inmediatamente mediante agitación vorticial durante 5 segundos después de añadir el tampón protector de ADN para proteger las muestras contra la degradación.

Tabla 1. Componentes de la reacción de bisulfito

Componente	Volumen por reacción (µl)
ADN	Variable* (40 µl máximo)
Agua libre de RNasa	Variable*
Solución de bisulfito	85
Tampón protector de ADN	15
Volumen total	140

* El volumen combinado de ADN y agua libre de RNasa debe ser un total de 40 µl.

3. Cierre los tubos para PCR y mezcle inmediatamente las reacciones de bisulfito a fondo. Almacene los tubos a temperatura ambiente (15-25 °C).

Nota: El tampón protector de ADN debe pasar de verde a azul tras añadir la mezcla de solución de bisulfito de ADN, lo que indica que se ha mezclado lo suficiente y que el pH es correcto para la reacción de conversión por bisulfito, o unión del ADN a la columna de centrifugación de ADN MinElute.

4. Realice la conversión de ADN de bisulfito con un ciclador térmico. Programa el ciclador térmico como se indica en la Tabla 2, en la página siguiente.

El ciclo completo debe durar aproximadamente 30 minutos.

Nota: Si se usa un ciclador térmico que no le permite introducir el volumen de reacción (140 µl), establezca el instrumento en el ajuste de volumen más elevado que esté disponible.

Tabla 2. Condiciones del ciclador térmico para la conversión por bisulfito

Paso	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min	95 °C
Incubación	10 min	60 °C
Desnaturalización	5 min	95 °C
Incubación	10 min	60 °C
Mantener	Indefinido*	20 °C

* El ADN convertido se puede dejar en el ciclador térmico durante la noche sin que se vea afectado su rendimiento.

5. Coloque los tubos para PCR que contienen las reacciones de bisulfito en el ciclador térmico. Inicie la incubación de ciclado térmico.

IMPORTANTE: Ya que la reacción de bisulfito no se superpone con aceite mineral, solo los cicladores térmicos con tapas térmicas son adecuados para este procedimiento. Es importante usar tubos para PCR que se cierren herméticamente.

Nota: El ADN convertido se puede dejar en el ciclador térmico durante la noche sin que se vea afectado su rendimiento.

Limpieza de ADN de conversión por bisulfito

6. Una vez completada la conversión por bisulfito, centrifugue brevemente los tubos para PCR que contienen las reacciones de bisulfito y, a continuación, transfiera las reacciones de bisulfito completas para limpiar tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml. La transferencia de los precipitados de la solución no afectará el rendimiento o a la producción de la reacción.
7. Añada 310 µl de tampón BL a cada muestra. Mezcle la solución mediante agitación vorticial y, a continuación, centrifúguela brevemente.

8. Añada 250 µl de etanol (96 %-100 %) a cada muestra. Mezcle las soluciones mediante agitación vorticial con pulsos durante 15 segundos y centrifúguelas brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa.
 9. Coloque el número necesario de columnas de centrifugación de ADN MinElute y de tubos de recogida en una gradilla adecuada. Transfiere toda la mezcla de cada tubo (paso 8) a la columna de centrifugación de ADN MinElute correspondiente.
 10. Centrifugue las columnas de centrifugación a velocidad máxima durante 1 minuto. Deseche el líquido y coloque las columnas de centrifugación de nuevo en los tubos de recogida.
 11. Añada 500 µl de tampón BW (tampón de lavado) a cada columna de centrifugación y centrifugue a máxima velocidad durante 1 minuto. Deseche el líquido y coloque las columnas de centrifugación de nuevo en los tubos de recogida.
 12. Añada 500 µl de tampón BD (tampón de desulfonación) a cada columna de centrifugación e incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (15 °C-25 °C).
Si hay precipitados en el tampón BD, evite que se transfieran a las columnas de centrifugación.
- IMPORTANTE:** El frasco que contiene tampón BD debe cerrarse inmediatamente después de su uso para evitar la acidificación del dióxido de carbono en el aire.
- Nota:** Es importante cerrar las tapas de las columnas de centrifugación antes de la incubación.
13. Centrifugue las columnas de centrifugación a velocidad máxima durante 1 minuto. Deseche el líquido y coloque las columnas de centrifugación de nuevo en los tubos de recogida.
 14. Añada 500 µl de tampón BW a cada columna de centrifugación y centrifugue a máxima velocidad durante 1 minuto. Deseche el líquido y coloque las columnas de centrifugación de nuevo en los tubos de recogida.
 15. Repita el paso 14 una vez.
 16. Añada 250 µl de etanol (96 %-100 %) a cada columna de centrifugación y centrifugue a máxima velocidad durante 1 minuto.

-
17. Coloque las columnas de centrifugación en tubos de recogida nuevos de 2 ml (suministrados) y centrifugue las columnas de centrifugación a velocidad máxima durante 1 minuto para eliminar todo líquido residual.
18. Coloque las columnas de centrifugación con las tapas abiertas en un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml (no suministrado) e incube las columnas durante 5 minutos a 60 °C en un bloque térmico. Este paso garantiza la evaporación de todos los restos de líquido.
19. Añada 15 µl de tampón EB (tampón de elución) directamente al centro de la membrana de cada columna de centrifugación y cierre las tapas con cuidado.
- Nota:** No realice la elución con menos de 15 µl de tampón, ya que el volumen de eluato sería demasiado escaso para continuar con el paso de qPCR.
20. Incube las columnas de centrifugación a temperatura ambiente durante 1 minuto.
21. Centrifugue durante 1 minuto a 15 000 x g (12 000 rpm) para eluir el ADN.
- Nota:** Recomendamos almacenar el ADN purificado a una temperatura entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de 24 horas. Cuando se almacene ADN purificado durante un periodo superior a 24 horas, recomendamos un almacenamiento a una temperatura entre -30 °C y -15 °C.

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

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR debe ejecutarse en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* con la interpretación automatizada de los resultados del software Rotor-Gene AssayManager v2.1.

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.

Nota importante: Si está usando el software Rotor-Gene AssayManager v2.1, el complemento Gamma y el perfil de ensayo por primera vez, consulte la sección "Instalación del software Rotor-Gene AssayManager v2.1, el complemento Gamma e importación del perfil de ensayo" en la página 54 para ver las instrucciones de instalación. Si el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 software, el complemento Gamma y el perfil de ensayo ya se han instalado e importado en su ordenador, continúe con las siguientes instrucciones:

Configuración de la qPCR

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR contiene productos para analizar ocho muestras en un máximo de tres series.

* 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.

Antes de comenzar

- Enfíe un bloque de carga de 72 tubos de 0,1 ml durante 10 minutos en un congelador o bien durante al menos 1 hora a temperatura de refrigeración.
- Descongele todos los componentes del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR y las muestras en un refrigerador, en hielo, en un bloque de enfriamiento o a temperatura ambiente durante el tiempo que sea necesario.

Nota: Si la descongelación se realiza a temperatura ambiente, compruebe con regularidad si el material se ha descongelado ya, especialmente la mezcla maestra (MMx) de PITX2 RGQ PCR, ya que contiene dNTP que son sensibles a la temperatura.

Nota: PITX2 RGQ PCR PPM se debe proteger de la luz solar, ya que contiene nucleótidos de fluoróforo.

- Coloque los productos descongelados en hielo, en un bloque de enfriamiento o en un refrigerador hasta que vuelvan a estar a una temperatura entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ tras su uso.

Nota: Los componentes del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se pueden mantener a una temperatura entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se deben proteger de la luz durante un máximo de 6 horas si se utiliza varias veces en el mismo día.

Nota: Los componentes del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se pueden usar durante un máximo de cuatro ciclos de congelación-descongelación.

- Limpie la zona de trabajo dedicada a la preparación de la mezcla de PCR para reducir el riesgo de contaminación de moldes y nucleasas.
- Aplique agitación vorticial a los tubos (entre 10 y 12 segundos) y, a continuación, centrifúguelos brevemente antes de su uso. Excepto la mezcla maestra (MMx) de PITX2 RGQ PCR, que se mezcla mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo, ya que contiene polimerasa *Taq*.

Procedimiento

1. Prepare la mezcla de reacción de qPCR de PITX2 **en hielo** (o empleando un bloque de enfriamiento) en un tubo de 1,5 ml o 2 ml (no suministrado) en función del número de muestras que se vayan a procesar.

El esquema de pipeteo para la preparación de la mezcla de reacción de PITX2 que aparece en la Tabla 3 (página siguiente) se ha calculado para alcanzar volúmenes de reacción finales de 20 μ l tras añadir 4 μ l de muestra de ADNbis o control. Se incluye un volumen adicional para compensar los errores de pipeteo y permitir la preparación de suficiente mezcla de reacción para cuatro muestras analizadas por duplicado más cuatro controles. Si se analizan menos muestras, la mezcla de reacción se puede preparar en consonancia. Recuerde permitir un volumen adicional para compensar los errores de pipeteo (un pocillo adicional para un máximo de 10 pocillos y dos pocillos adicionales para un máximo de 20 pocillos).

Tabla 3. Preparación de la mezcla de reacción de *therascreen* PITX2 RGQ PCR

Componente	1 reacción (μ l)	Ejemplo de placa de 12 pocillos: 12+2 reacciones adicionales (μ l)*
Mezcla maestra para PITX2 RGQ PCR	10	140
Mezcla de sonda de cebadores para PITX2 RGQ PCR	6	84
Volumen total de mezcla de reacción para qPCR (μ l)	16	224
Distribución de mezcla de reacción para qPCR	16 μ l por tubo	
Distribución de muestras	4 μ l por tubo	
Volumen total de reacción de qPCR	20 μ l	

* Se incluye un volumen de reacción adicional para compensar los errores de pipeteo: un pocillo adicional para un máximo de 10 pocillos y dos pocillos adicionales para un máximo de 20 pocillos.

2. Aplique agitación vorticial (entre 10 y 12 segundos) y centrifugue brevemente la mezcla de reacción de qPCR de PITX2. Coloque los tubos de tira para qPCR en un bloque de carga enfriado previamente para 72 tubos y dispense 16 μ l de la mezcla de reacción de qPCR de PITX2 por cada tubo de tiras según el ejemplo de configuración del bloque de carga que se muestra en la Figura 4.

Nota: Se recomienda dispensar los 16 µl de la mezcla de reacción mediante pipeteo inverso.

1	REF50	9	Sample 3	17	NA	25	NA	33	NA	41	NA	49	NA	57	NA	65	NA
2	REFlow	10	Sample 3	18	NA	26	NA	34	NA	42	NA	50	NA	58	NA	66	NA
3	NC	11	Sample 4	19	NA	27	NA	35	NA	43	NA	51	NA	59	NA	67	NA
4	NTC	12	Sample 4	20	NA	28	NA	36	NA	44	NA	52	NA	60	NA	68	NA
5	Sample 1	13	NA	21	NA	29	NA	37	NA	45	NA	53	NA	61	NA	69	NA
6	Sample 1	14	NA	22	NA	30	NA	38	NA	46	NA	54	NA	62	NA	70	NA
7	Sample 2	15	NA	23	NA	31	NA	39	NA	47	NA	55	NA	63	NA	71	NA
8	Sample 2	16	NA	24	NA	32	NA	40	NA	48	NA	56	NA	64	NA	72	NA

Figura 4. Configuración del bloque de carga para un experimento con el kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR, análisis de cuatro muestras. Los números indican posiciones en el bloque de carga e indican la posición final del rotor. Las posiciones de los controles se establecen en el perfil de ensayo de PITX2 y no se pueden cambiar. Si los controles no se colocan como se indica, no se puede realizar el análisis automatizado de los resultados. **REF50:** referencia 50 de PITX2 RGQ PCR; **REFlow:** referencia baja de PITX2 RGQ PCR; **NC:** control negativo de PITX2 RGQ PCR, **NTC:** NTC de PITX2 RGQ PCR (NTC); **Muestra de 1 a 4:** muestras de ADNbis, **NA:** pocillo vacío.

3. Aplique agitación vorticial (entre 10 y 12 segundos) y centrifugue brevemente las muestras de ADNbis, la referencia 50 de PITX2 RGQ PCR (Ref50), la referencia baja de PITX2 RGQ PCR (RefLow), el control negativo de PITX2 RGQ PCR (NC) y el NTC de PITX2 RGQ PCR (NTC).
4. Añada 4 µl de muestra o material de control al tubo correspondiente según la configuración que se indica en la Figura 4 para obtener un volumen total de 20 µl. Mezcle suavemente 5 veces 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 no específico.
5. Cierre todos los tubos y compruebe que no haya burbujas en el fondo de los mismos.
6. Vuelva a almacenar todos los componentes y las muestras del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR según las condiciones de almacenamiento adecuadas para evitar la degradación de los materiales.

Preparación del equipo Rotor-Gene MDx

Se recomienda encarecidamente ejecutar la serie lo antes posible después de la preparación; no obstante, si la placa se prepara pero no se puede ejecutar directamente (debido a que el equipo no está disponible), es posible almacenar la placa a una temperatura entre 2 °C y 8 °C y protegida de la luz durante un máximo de 24 horas (consulte "Periodo en uso", página 80).

7. Coloque un rotor de 72 pocillos en el soporte del rotor Rotor-Gene Q MDx.
8. Llene el rotor con tubos de tiras ya preparados según las posiciones asignadas, comenzando en la posición 1, como se muestra en la Figura 5.
9. Complete las posiciones vacías con tubos vacíos y cerrados para llenar el rotor por completo.


Nota: Asegúrese de insertar el primer tubo en la posición 1 y de orientar correctamente los tubos de tiras y colocarlos en las posiciones adecuadas (es importante para la validez y la trazabilidad de la muestra en la serie), tal como se muestra en la Figura 5.

Nota: Mantenga siempre los cuatro controles (REF50, REFlow, NC y NTC) en las posiciones de la 1 a la 4 de forma que la optimización de la ganancia (realizada en la posición de tubo 1) se realice siempre en la misma amplificación. Asegúrese de que los controles se cargan en el orden correcto para el análisis automatizado de los controles (si se invierten los controles, se invalidará el análisis mediante el perfil de ensayo de PITX2).

Creación de una lista de trabajo e inicio del análisis de qPCR

Nota: La lista de trabajo se puede crear y guardar antes de preparar las muestras o bien cuando el experimento se configura en el equipo como se describe en este manual.

12. Encienda el equipo Rotor-Gene Q MDx.

13. Abra el software Rotor-Gene AssayManager haciendo clic en el icono: . Se abre la ventana de Rotor-Gene AssayManager (Figura 6).

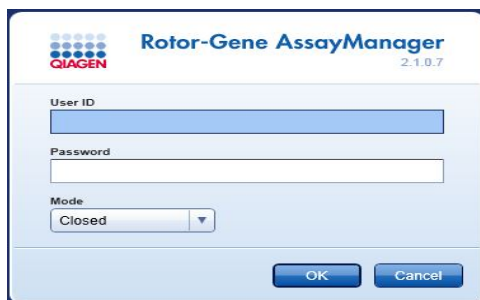


Figura 6. Pantalla de inicio de sesión de Rotor-Gene AssayManager.

14. Inicie sesión como usuario con la función "Operator" (Operador) en el modo cerrado. Haga clic en "OK" (Aceptar). Se abre la ventana de Rotor-Gene AssayManager (Figura 7, siguiente página).

15. Compruebe que el RGQ se detecta correctamente con el software antes de ejecutar la serie.

16. Seleccione la pestaña "Setup" (Configuración).

Nota: Las funciones generales del entorno "Setup" y de "Creating/Editing a Work List" (Creación/edición de una lista de trabajo) se describen en el *manual de usuario de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

17. Haga clic en "New work list" (Nueva lista de trabajo) (Figura 7).

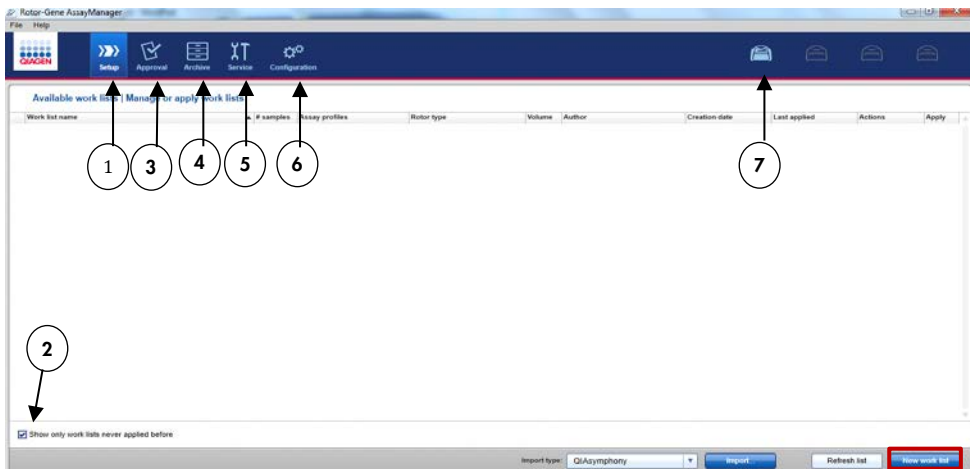




Figura 7. Descripción de las distintas pestañas presentes en el software RGAM.

- | | |
|--|--|
| <p>1 Pestaña "Setup" Esta pestaña permite gestionar o aplicar listas de trabajo.</p> <p>2 Comprobación de listas de trabajo aplicadas. Muestra solamente listas de trabajo nuevas. Ya se ha realizado una "lista de trabajo aplicada".</p> <p>3 Pestaña "Approval" (Aprobación) Esta pestaña le permite buscar experimentos anteriores.</p> <p>4 Pestaña "Archive" (Archivo) Le permite buscar experimentos antiguos que ya se han aprobado.</p> | <p>5 Pestaña "Service" (Servicio) Muestra el informe de un seguimiento de auditoría de cada archivo que el software ha generado.</p> <p>6 Ficha "Configuration" (Cofiguración). Permite configurar todos los parámetros del software.</p> <p>7 Iconos de Rotor-Gene Q MDx (RGQ):</p> <p> No conectado  Conectado</p> |
|--|--|

18. Seleccione el perfil de ensayo de PITX2 de la lista de perfiles de ensayo disponibles (Figura 8).

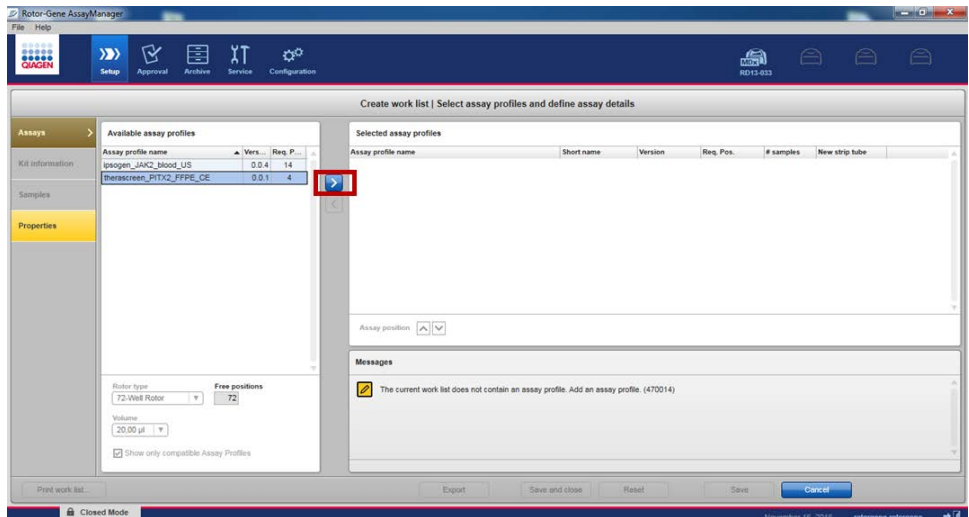


Figura 8. Importación de perfil de análisis.

19. Transfiera el perfil de ensayo seleccionado a la lista de perfiles de ensayo seleccionados. Para ello, haga clic en la flecha (a la derecha del nombre del perfil de ensayo). Ahora, el perfil de ensayo debería mostrarse en la lista "Selected assay profiles" (Perfiles de ensayo seleccionados) (Figura 8).

20. En la pestaña "Assays" (Ensayos), complete los campos de color amarillo: Número de muestras (hasta 8) según la configuración de su placa (Figura 9).

Nota: El número de muestras no corresponde con el número de pocillos y no incluye controles. Las muestras se analizan por duplicado y, por tanto, una muestra corresponde a dos pocillos. Por ejemplo, se van a insertar 4 muestras para la placa de 12 pocillos que se presenta en la Figura 4 (página 41).

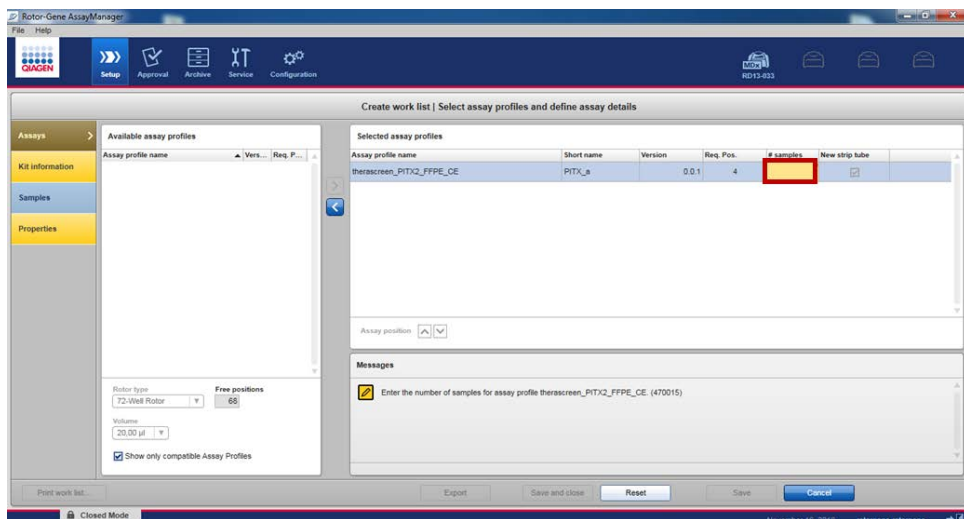


Figura 9. Introducción del número de muestras.

21. Seleccione la pestaña "Kit Information" (Información del kit). Inserte la información del kit; para ello, puede seleccionar "Use kit bar code" (Usar código de barras del kit) y escanear el código de barras, o bien seleccionar "Enter kit information manually" (Introducir información del kit manualmente) e insertar manualmente la información del kit que se encuentra en la etiqueta de la caja del kit *therascreen* PITX2 RQG PCR:



Número de material



Fecha de vencimiento



Número de lote

22. Seleccione la pestaña "Samples" (Muestras). Se muestra una lista con información detallada de las muestras. Esta lista representa la distribución prevista del rotor.

23. Introduzca la identificación de la muestra, así como toda información de la muestra opcional, como comentario en cada muestra (Figura 10).

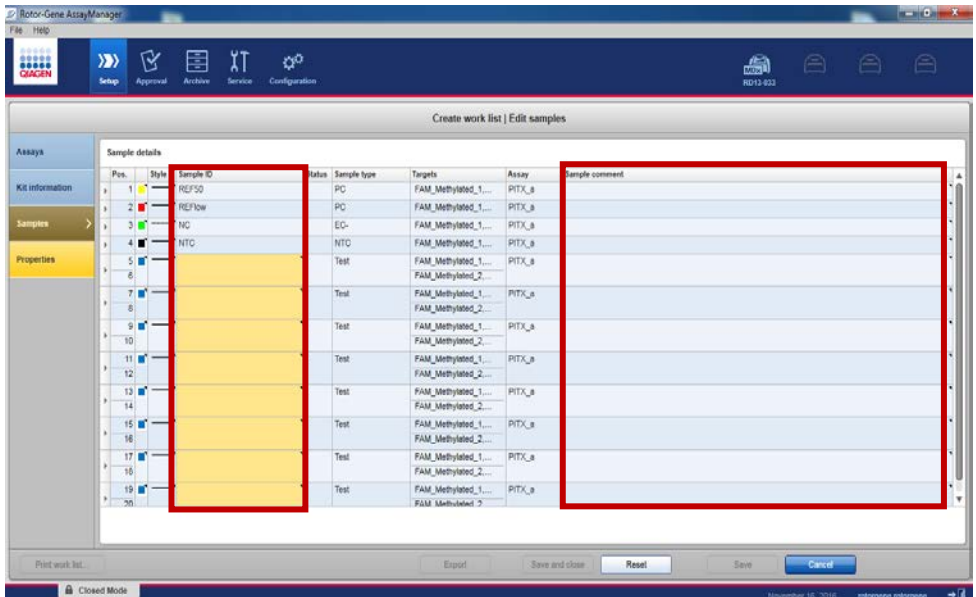


Figura 10. Ajustes de muestra.

24. Seleccione "Properties" (Propiedades) e introduzca un nombre de lista de trabajo (Figura 11).

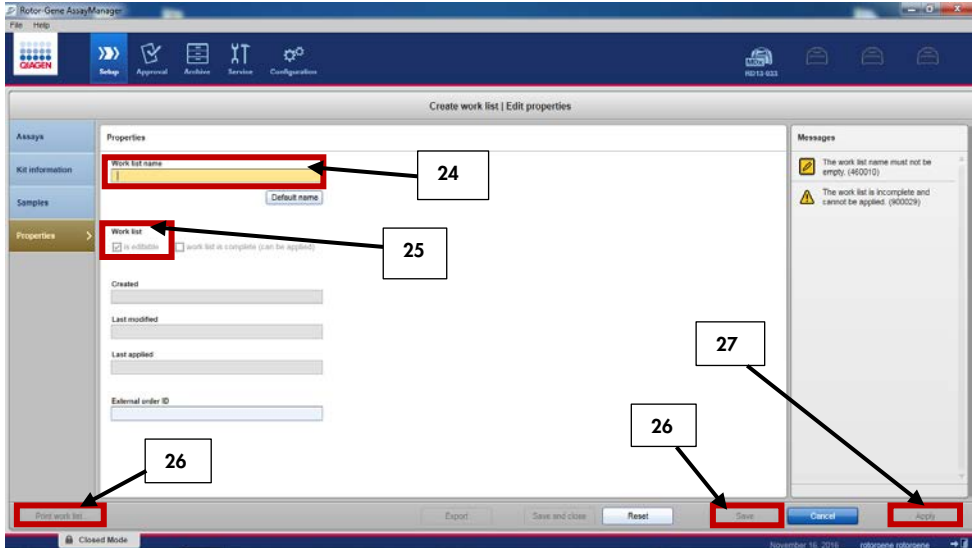


Figura 11. Creación de la lista de trabajo.

25. Marque la casilla de verificación "worklist is complete (can be applied)" (lista de trabajo completa, se puede aplicar).

26. Guarde la lista de trabajo.

Opcional: 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 serie. La información detallada de las muestras se incluye como parte de la lista de trabajo.

27. 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: Compruebe que el Rotor-Gene Q MDx se detecta correctamente con el software antes de ejecutar la serie.

28. Introduzca el nombre del experimento.

29. Seleccione el termociclador que se va a utilizar en "Cycler selection" (Selección del termociclador).

Nota: Debe utilizarse un termociclador Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

30. Compruebe que el anillo de fijación esté bien colocado y confírmelo en la pantalla.

31. Haga clic en "Start run" (Iniciar serie). La serie qPCR debería empezar.

Liberación y comunicación de los resultados de la qPCR

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

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 de las normas y parámetros definidos en el perfil de ensayo.

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

1. Cuando la serie haya finalizado, haga clic en "Finish run" (Finalizar serie) para analizar y exportar los datos.

Nota: El experimento se guarda en la base de datos interna solamente cuando ha finalizado este paso.

2. Después de hacer clic en "Finish run", introduzca la contraseña y haga clic en "Release and go to approval" (Liberar y pasar a aprobación) (Figura 12).

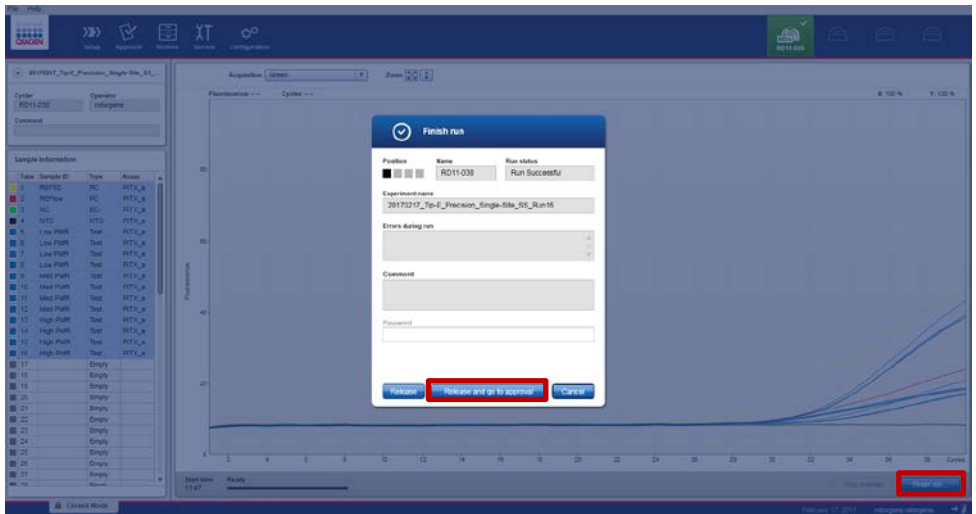


Figura 12. Duración de la serie.

Los usuarios que hayan iniciado sesión con la función "Approver" pueden hacer clic en "Release and go to approval".

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

Si ha hecho clic en "Release and go to approval", se mostrarán los resultados del experimento en el entorno "Approval".

Si un usuario con la función "Operator" ha hecho clic en "Release", otro usuario con la función "Approver" deberá iniciar sesión y seleccionar el entorno "Approval".

Nota: En la pestaña "Approval", se pueden analizar los experimentos cambiando entre pestañas (es decir, experimento, ensayo, seguimiento de auditoría, serie, control, resultados).

3. Compruebe las curvas de amplificación de cada muestra, marque la primera casilla del lado derecho de la columna "flags" (indicadores) y la columna se volverá verde (Figura 13).

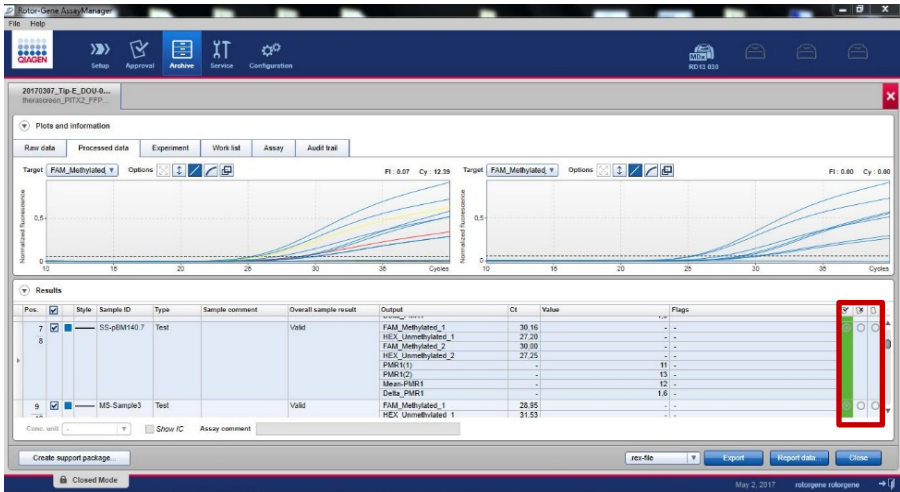


Figura 13. Comprobación de la curva de amplificación.

- Haga clic en "Release/report data" (Liberar/notificar datos), que se encuentra en la parte inferior derecha de la ventana), para crear un informe en .pdf y guardar el archivo del LIMS (se guarda automáticamente una copia en C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Reports).
- Cierre el archivo pdf y vuelva a Rotor-Gene AssayManager. Haga clic en "OK" cada vez que se solicite.
- Vaya a la pestaña "Archive" para exportar el archivo .rex. Compruebe que los valores de "start date" (fecha de inicio) y "end date" (fecha de finalización) son correctos y haga clic en "apply filter" (aplicar filtro). Seleccione el experimento que va a exportar y, a continuación, haga clic en "Show assays" (Mostrar ensayos) (Figura 14).

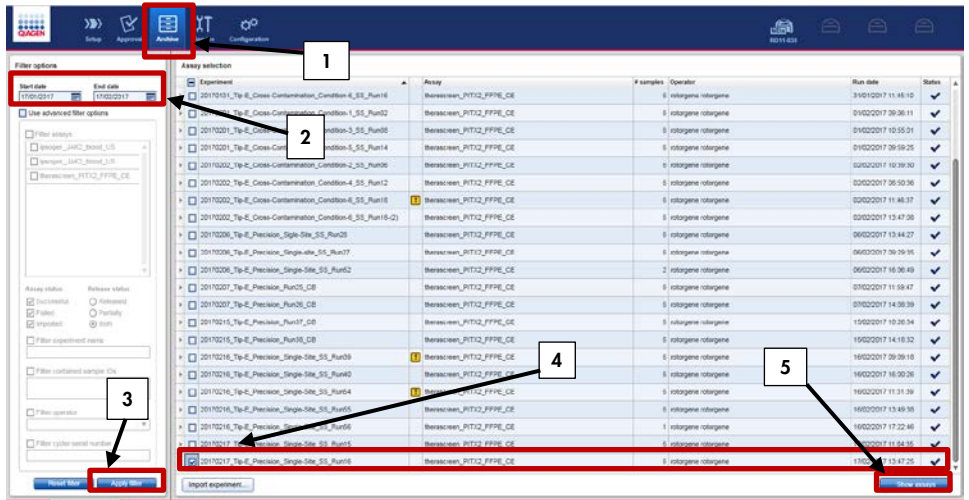


Figura 14. Exportar los datos de la serie.

- Exporte el archivo .rex (el archivo se guarda en C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Experiments).

Nota: El software genera automáticamente un archivo del LIMS en C:\Documents and settings\All Users\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\LIMS

- 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" o "Archive". Para obtener más información, consulte el apartado "Creating a support package" (Creación de un paquete de asistencia) en la *manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

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". Para obtener más información, consulte el *manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Instalación del software Rotor-Gene AssayManager v2.1, el 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: **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 *manual de usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core*. 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*).

Para la interpretación automática de los resultados con el kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR con el software Rotor-Gene AssayManager v2.1, se debe instalar el complemento Gamma más reciente en su Rotor-Gene AssayManager v2.1. Consulte "Product Resources" (Recursos del producto) en la página del producto Rotor-Gene AssayManager v2.1: **www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx** para acceder a la última versión del complemento.

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR también necesita un perfil de ensayo. El perfil de ensayo contiene todos los parámetros necesarios para realizar el ciclado y el análisis del ensayo de PITX2. Estos parámetros están bloqueados para la serie. El perfil de ensayo de PITX2 (AP_therascreen_PITX2_FFPE_CE) corresponde a un archivo ".iap" que se puede descargar desde la página del producto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR: **www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/therascreen-pitx2-rgq-pcr-kit-ce/** en la pestaña "Product Resources" en "Protocol Files" (Archivos del protocolo). El perfil de ensayo debe importarse al software Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Los detalles sobre la instalación del complemento Gamma y la importación del perfil de ensayo al software Rotor-Gene AssayManager v2.1 son los siguientes.

1. Descargue el complemento Gamma de **www.qiagen.com**.
2. Inicie el proceso de instalación haciendo doble clic en el archivo GammaPlugin.Installation.msi y siguiendo las instrucciones de instalación. Para ver una descripción detallada de este proceso, consulte el apartado sobre la instalación de complementos del AssayManager Core Application User Manual (*manual del usuario de la AssayManager Core Application*).
3. Tras instalar correctamente el complemento, un usuario con derechos de administrador del software Rotor-Gene AssayManager deberá importar el perfil de ensayo como se indica a continuación:
4. Vaya al explorador de Windows y guarde el perfil de ensayo en el siguiente archivo: "C:\Documents and Settings\All Users\Documents\QIAGEN\Rotor-GeneAssayManager\Import\AssayProfiles".
5. Abra el software Rotor-Gene AssayManager haciendo clic en el  icono.
6. Inicie sesión en Rotor-Gene AssayManager con su ID de usuario y su contraseña. No cambie el "Closed mode" (Modo cerrado). Haga clic en "OK". Se abre la ventana de Rotor-Gene AssayManager.
7. Seleccione el entorno de configuración (Figura 15).

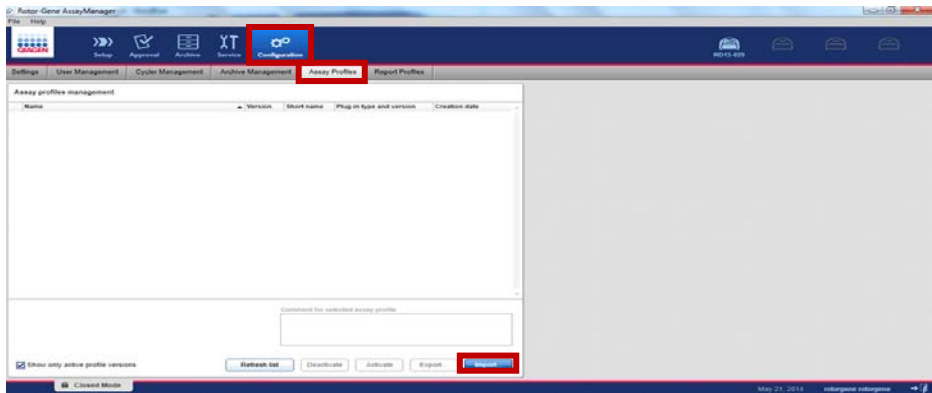


Figura 15. Ficha "Configuration" (Configuración).

8. Seleccione la pestaña "Assay Profiles" (Perfiles de ensayo).
9. Haga clic en "Import" (Importar).
10. Seleccione el perfil de ensayo AP_therascreen_PITX2_FFPE_CE_V1.0.x.iap (x = 1 o superior) que se va a importar en el cuadro de diálogo y haga clic en "Open" (Abrir).
11. Una vez que el perfil de ensayo se ha importado correctamente, se puede utilizar en el entorno "Setup".

Interpretación de los resultados

Análisis de los datos

El análisis de los resultados del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR con cada control y cada muestra se realiza automáticamente mediante el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 junto con el complemento Gamma v1.0 y el perfil de ensayo de PITX2, a partir de ahora denominado PITX2 Assay Package (paquete de ensayo de PITX2).

PITX2 Assay Package analiza curvas de amplificación y puede invalidar curvas que no se ajustan en función de su forma y de la amplitud del ruido. En este caso, se asociará un indicador con la curva invalidada. Se pueden mostrar también indicadores de advertencia en el caso de anomalías de curva que no invalidadas (consulte la lista de indicadores en la sección "Indicadores", página 63).

Para determinar la validez del ensayo, PITX2 Assay Package analiza además los controles de serie, es decir, la referencia 50 de PITX2 RGQ PCR (REF50), la referencia baja de PITX2 RGQ PCR (REFlow), el control negativo (NC) de PITX2 RGQ PCR y el NTC de PITX2 RGQ PCR (NTC). La validez de cada control se basa en el cumplimiento de los valores de C_T y/o PMR con especificaciones predefinidas (consulte "Resultados globales de las muestras", en la página 61, y "Indicadores", en la página 63).

Nota: Si hay al menos un control no válido, los resultados obtenidos con todas las muestras de la prueba se consideran inválidos y no se muestra ningún resultado de PMR.

PITX2 Assay Package también analiza las muestras mediante la comprobación de la validez de los duplicados y la validez de la entrada (consulte "Resultados globales de las muestras", en la página 61, "Indicadores", en la página 63). Finalmente, se asigna un valor de PMR sin dígitos a las muestras según el significado de los dos resultados de PMR obtenidos con cada repetición de muestra. La PMR obtenida con cada paciente proporcionará información al

médico encargado del tratamiento acerca de la probabilidad de que el paciente responda a la quimioterapia basada en antraciclina. Si la PMR obtenida es igual o inferior a 12, es probable que el paciente responda a la quimioterapia basada en antraciclina. Por el contrario, si la PMR obtenida es superior a 12, se puede proponer un tratamiento alternativo, ya que existe una probabilidad menor de que el paciente responda a la quimioterapia basada en antraciclina (Figura 16).

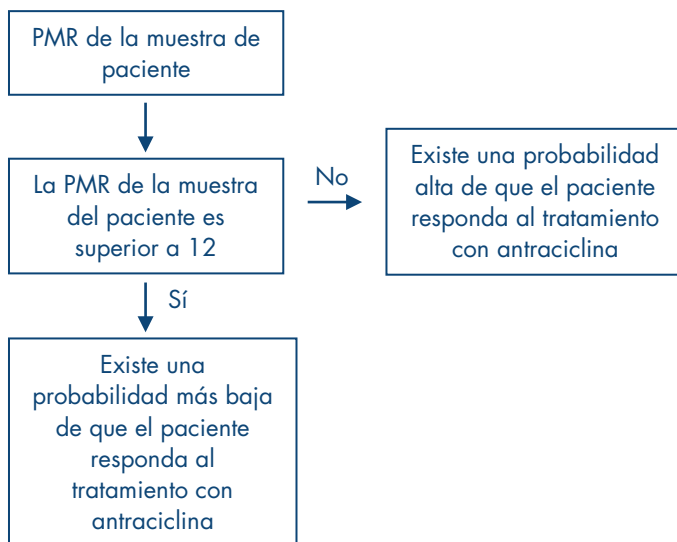


Figura 16. Interpretación de los resultados de PMR de muestras de un paciente con el kit *thetascreen* PITX2 RGQ PCR.

Los resultados de las muestras de la prueba, definidos y analizados automáticamente por el software PITX2 Assay Package, tienen que ser aprobados y liberados por un usuario que haya iniciado sesión con la función "Approver". 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 *manual de usuario del complemento Gamma de Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

Nota sobre el control de flujo de trabajo: la muestra HD216 (control de flujo de trabajo) debe generar un valor de PMR entre 30 y 50. Si esta PMR se obtiene con este control de flujo de trabajo, se puede validar tanto el paso de purificación de ADNg como el de conversión por bisulfito.

Si existen resultados no válidos, consulte "Guía de resolución de problemas", en la página 68.

Repetición del análisis

Si existen resultados no válidos, se deben repetir las pruebas. Si el ensayo no es válido, es decir, si uno de los cuatro controles no es válido, se debe volver a realizar la serie completa con todas las muestras analizadas. Si el ensayo es válido pero una o varias muestras no son válidas, las muestras no válidas se deben volver a analizar tras investigar el tipo de error (consulte "Indicadores", en la página 63, Tabla 6 y Tabla 7, en las páginas 64–65). En la Figura 17 se muestra un flujo de trabajo del procedimiento de repetición de prueba.

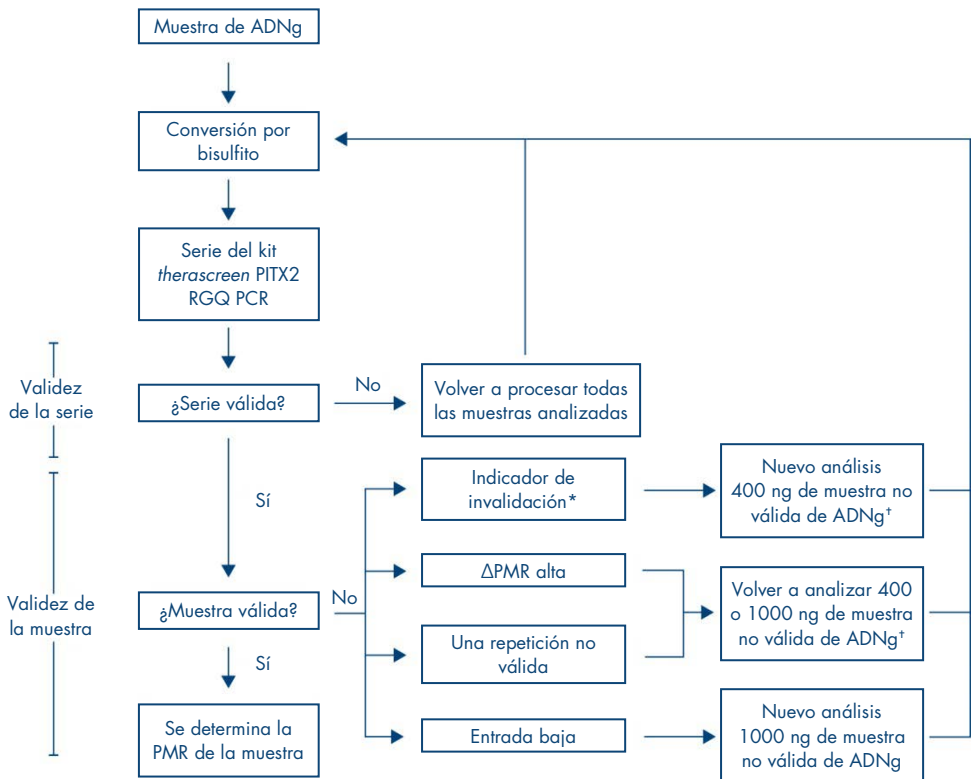


Figura 17. Flujo de trabajo de repetición de análisis del kit *theascreen* PITX2 RGQ PCR.

* Consulte Tabla 6 y Tabla 7, páginas 64–65.

† Se puede usar una entrada de 200 ng si no hay disponible suficiente ADNg; no obstante, el riesgo de obtener un resultado no válido debido a un indicador de "entrada baja" es mayor.

Visualización de los resultados

Dianas y dianas combinadas

Los resultados de cada reacción del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se muestran bajo los siguientes nombres de diana y de diana combinada:

- "FAM_Methylated_1": resultados del canal verde de todos los controles y de la repetición 1 de las muestras de la prueba.
- "FAM_Methylated_2": resultados del canal verde de la repetición 2 de las muestras de la prueba.
- "HEX_Unmethylated_1": resultados del canal amarillo de todos los controles y de la repetición 1 de las muestras de la prueba.
- "HEX_Unmethylated_2": resultados del canal amarillo de la repetición 2 de las muestras de la prueba.
- "PMR": estas dianas son combinadas; el resultado correspondiente tiene en cuenta la validez de los controles. Estas dianas se muestran para todos los controles y muestras de la prueba, si son válidas.
- "Mean_PMR": estas dianas son combinadas; el resultado correspondiente tiene en cuenta la validez de los controles. Estas dianas se muestran para todas las muestras de la prueba, si son válidas.

Resultados globales de las muestras

La conclusión del análisis para cada muestra y control se indica en la columna "Overall Sample Result" (Resultado global de la muestra) del informe (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados globales de la muestra y acciones

Resultado global de la muestra	Tipo de muestra	Descripción	Acción
Válido	REF50, REFlow, NC, NTC y muestra de la prueba*	El control o la muestra de la prueba es válido	N/D
No válido†	REF50, REFlow, NC, NTC y muestra de la prueba	El control no es válido	Repetir toda la serie
No válido	Muestra de la prueba	La muestra de la prueba no es válida	Configurar una nueva serie para repetir las muestras no válidas
No válida, una repetición no válida	Muestra de la prueba	Si una de las dianas (FAM_Methylated_1, FAM_Methylated_2, HEX_Unmethylated_1 o HEX_Unmethylated_2) no es válida, la muestra se considera no válida	Configurar una nueva serie para repetir las muestras no válidas
No válida, PMR delta alta‡	Muestra de la prueba	El valor de la PMR delta entre la primera repetición y la segunda repetición es superior a un valor específico §, la muestra se considera no válida	Configurar una nueva serie para repetir las muestras no válidas

* La interpretación del resultado de la PMR válido de la muestra de la prueba se explicó anteriormente (consulte la Figura 16).

† Cuando los controles no son válidos, los valores de C_T no válidos y los resultados de la PMR se muestran entre corchetes para ofrecer información.

‡ Cuando una muestra no es válida debido a una PMR delta alta, los valores de C_T y los resultados de la PMR de ambas repeticiones, así como la PMR media, se muestran para ofrecer información. Sin embargo, la muestra se debe volver a analizar para obtener un resultado válido.

§ El valor específico varía en función del valor de PMR obtenido con cada muestra (consulte Tabla 5, página siguiente).

Tabla 5. Criterios de PMR delta

Mean-PMR	Duplicados de PMR delta
0-1	≤1
1-5	≤5
5-10	≤7
10-15	≤9
15-35	≤13
35-65	≤15
65-85	≤18
85-100	≤6

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 *manual de usuario del complemento Gamma de Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

El análisis automatizado del ensayo del kit *therascreen PITX2 RGQ PCR* puede proporcionar indicadores específicos de ambos ensayos (Tabla 6, página siguiente) e indicadores generales (Tabla 7, página 65).

Tabla 6. Indicadores específicos del ensayo

Indicador específico del ensayo	Tipo de muestra	Descripción	Acción
Indicadores específicos del ensayo para controles			
BELOW_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFlow	El resultado de PMR es inferior al rango aceptado (<36 para REF50, <2 para REFlow).	Repetir toda la serie
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFlow	El resultado de PMR es superior al rango aceptado (>65 para REF50, >13 para REFlow).	Repetir toda la serie
NO_SIGNAL	REF50	El valor de C _T de FAM_Methylated_1 y/o HEX_Unmethylated_1 diana es >32	Repetir toda la serie
NO_SIGNAL	REFlow	El valor de C _T de HEX_Unmethylated_1 diana es >32	Repetir toda la serie
Indicadores específicos del ensayo para muestras de la prueba			
PMR_ABOVE_OR_EQUAL_92*	Muestra de la prueba	El resultado de PMR es superior al límite de detección determinado para la sonda que establece como diana secuencias no metiladas anteriores. Este indicador no es de invalidación, sino de advertencia.	Ninguna
PMR_BELOW_OR_EQUAL_4*	Muestra de la prueba	El resultado de PMR es inferior al límite de detección determinado para la sonda que establece como diana secuencias metiladas anteriores. Este indicador no es de invalidación, sino de advertencia.	Ninguna
LOW_INPUT_RETEST_NEEDED	Muestra de la prueba	El valor de C _T de FAM_Methylated_1 y HEX_Unmethylated_1 o FAM_Methylated_2 y HEX_Unmethylated_2 diana es >32,5	Aumentar la entrada de ADN _g en la conversión por bisulfito y repetir la serie

* Ya que los resultados de PMR se proporcionan sin dígitos pero el software calcula la PMR con dígitos, el indicador del límite de detección puede estar presente o no para el valor en el límite de PMR, es decir, 4 y 92. De hecho, hay indicadores presentes de los resultados de PMR >92 e <4; de este modo, por ejemplo, un resultado de PMR en 4,1 o en 91,8, redondeados respectivamente en 4 y 92, no se indicarán como inferiores o superiores al límite de detección, respectivamente.

Nota: Todos los indicadores que se muestran son de invalidación, excepto los dos relacionados con el límite de detección. Cuando las repeticiones no son válidas, los valores de C_T se muestran entre corchetes para ofrecer información, pero no se muestra el resultado de PMR no válido. La PMR media de ambas repeticiones no se muestra.

Tabla 7. Indicadores generales

Indicador general	Comportamiento	Descripción	Acción
CONSECUTIVE_FAULT	No válido	Una diana utilizada para el cálculo de esta diana no es válida.	Repetir la muestra o la serie si se debe a un control no válido
ASSAY_INVALID	No válido	El ensayo no es válido porque como mínimo un control no es válido.	Repetir toda la serie.
ANALYSIS_FAILED	No válido	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	No válido	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.	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.
FLAT_BUMP	No válido	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).	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.
INVALID_CALCULATION	No válido	El cálculo de esta diana ha sido erróneo.	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.
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.	Ninguna
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Advertencia	La eficiencia de la reacción para esta muestra no ha alcanzado un límite definido.	Ninguna
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	No válido	La curva de amplificación excede el umbral en más de una ocasión. No se puede determinar un valor de C_T inequívoco.	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.
NO_BASELINE	No válido	No se ha encontrado ninguna referencia inicial. No se puede realizar el análisis posterior.	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.

RUN_FAILED	No válido	El ensayo se ha definido como no válido debido a un problema con el termociclador o con la conexión del termociclador.	Repetir toda la serie.
RUN_STOPPED	No válido	El ensayo se ha definido como no válido porque la serie se ha detenido manualmente.	Repetir toda la serie.
SATURATION	No válido	La fluorescencia de los datos iniciales presenta una saturación elevada antes del punto de inflexión de la curva de amplificación.	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.
SATURATION_IN_PLATEAU	Advertencia	La fluorescencia de los datos brutos muestra saturación en la fase de meseta de la curva de amplificación.	Ninguna
SPIKE	Advertencia	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 .	Ninguna
SPIKE_CLOSE_TO_CT	No válido	Se ha detectado un pico en la curva de amplificación próximo al valor de C_T .	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.
STEEP_BASELINE	No válido	Se ha detectado una referencia con crecimiento abrupto para la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación.	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.
STRONG_BASELINE_DIP	No válido	Se ha detectado un descenso abrupto en la referencia para la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación.	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.
STRONG_NOISE	No válido	Se ha detectado una señal de ruido fuerte fuera de la fase de crecimiento de la curva de amplificación.	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	No válido	Se ha detectado una señal de ruido fuerte en la fase de crecimiento (exponencial) de la curva de amplificación.	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	No válido	Se ha detectado una referencia ondulante para la fluorescencia de los datos iniciales en la curva de amplificación.	Repetir la muestra o la serie si esto se observa en un control.

Nota: En el caso de repeticiones de muestra que presentan un indicador de invalidación, los valores de C_T se muestran entre corchetes para ofrecer información, pero no se muestra el resultado de PMR no válido. La PMR media de ambas repeticiones no se muestra.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir durante la determinación del promotor 2 de PITX2 mediante el kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y/o los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en www.qiagen.com).

Para obtener información sobre la resolución de problemas de la solución de desparafinización (n.º de referencia 19093), el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n.º de referencia 60404) y el kit EpiTect Fast DNA Bisulfite (n.º de referencia 59824 o 59826), 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 correspondientes.

Comentarios y sugerencias

Rendimiento bajo de ADNg

La cantidad de ADNg purificado es inferior a los 400 ng recomendados para llevar a cabo el flujo de trabajo del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR

Se puede usar una entrada de 200 ng; no obstante, el riesgo de obtener un resultado no válido debido a un indicador de "entrada baja" es mayor.

Ensayo no válido debido a REFlow y/o REF50 no válido(s)

a) No se ha añadido un componente de la mezcla de reacción

Compruebe que la mezcla de reacción se haya preparado correctamente (Tabla 3, página 40). Compruebe que se hayan añadido todos los componentes de la mezcla de reacción de qPCR. Repita la serie de PCR.

Comentarios y sugerencias

- | | | |
|----|--|--|
| b) | 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. |
| c) | Error de los accesorios del equipo Rotor-Gene Q MDx | El rotor de 72 pocillos puede estar mal cerrado. Repita la serie de PCR. |
| d) | Degradación de la mezcla de reacción | El kit se ha congelado/descongelado más de cuatro veces, o bien el contenido del kit no se ha almacenado a una temperatura entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, o bien la PPM o la mezcla de reacción no se han protegido 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. Repita la serie de PCR. |
| e) | Inversión de tubos de tiras y/o ID de muestra | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Repita la serie de PCR. |
| f) | Faltan controles o se han cargado en una posición incorrecta | Asegúrese de que se ha cargado el control correcto en la posición correcta. |
| g) | Mezcla insuficiente de las muestras de control | La descongelación de los controles no se completó antes de la carga o el mezclado de los controles con la mezcla de reacción (pipeteo hacia arriba y abajo) no se realizó correctamente. Repita la serie de PCR. |
| h) | Volumen de pipeteo incorrecto | Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Compruebe que se haya añadido un volumen de $4\text{ }\mu\text{l}$ de control y un volumen de $16\text{ }\mu\text{l}$ de mezcla de reacción de qPCR. Realice una inspección visual de todos los volúmenes pipeteados.
Compruebe las pipetas y, si es necesario, vuelva a calibrarlas antes de repetir el paso de qPCR. |
| i) | Cierre del tubo ineficaz | El tubo no se ha tapado eficazmente, lo que causa evaporación durante la serie de qPCR. |

Comentarios y sugerencias

Ensayo no válido debido a control sin molde (NTC) o control negativo (NC) no válido(s)

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Contaminación cruzada o contaminación de reactivos | <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. Prepare la mezcla de reacción para PCR con material específico (pipetas, puntas, etc.).</p> <p>Prepare la mezcla de reacción 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>Repita la serie de PCR.</p> |
| b) | No se ha añadido un componente de la mezcla de reacción | <p>Compruebe que la mezcla de reacción se haya preparado correctamente (Tabla 3, página 40). Compruebe que se hayan añadido todos los componentes de la mezcla de reacción de qPCR. Repita la serie de PCR.</p> |
| c) | Inversión de tubos de tiras y/o ID de muestra | <p>Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Repita la serie de qPCR.</p> |
| d) | Degradación de la mezcla de reacción o las sondas | <p>Almacene el contenido del kit entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y proteja el tubo de PPM 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. Repita la serie de PCR.</p> |
| e) | Curva de amplificación incorrecta (artefactos) | <p>Revise la amplificación correspondiente en busca de curvas inusuales (p. ej., líneas rectas).</p> <p>Repita la serie de qPCR.</p> |

Muestra no válida debido a indicador de "entrada baja"

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Condiciones del bloque FFPE | <p>Compruebe las condiciones de transporte/almacenamiento del bloque FFPE usado.</p> |
| b) | Preparación del bloque FFPE | <p>Asegúrese de que la mezcla se ha fijado entre un 4 % y un 10 % de formalina. Compruebe que una o dos secciones de $5\text{ }\mu\text{m}$ de grosor se ha cortado para obtener 100 mm^2 de superficie de tejido para garantizar una cantidad suficiente de células.</p> |
| c) | Volumen de pipeteo posiblemente incorrecto | <p>Revise el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción. Compruebe que se haya añadido un volumen de $4\text{ }\mu\text{l}$ de muestra y un volumen de $16\text{ }\mu\text{l}$ de mezcla de reacción de qPCR. Realice una inspección visual de todos los volúmenes pipeteados.</p> <p>Compruebe las pipetas y, si es necesario, vuelva a calibrarlas antes de repetir el paso de qPCR.</p> |

Comentarios y sugerencias

- | | |
|--|---|
| d) Error en la conversión por bisulfito o en la purificación de ADNg | Compruebe si el control de flujo de trabajo ha generado resultados inesperados. Asegúrese de que el protocolo de flujo de trabajo del kit <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR se haya seguido, como se describe anteriormente. Asegúrese de que los kits no hayan caducado y los reactivos se hayan preparado correctamente (p. ej., se ha añadido etanol y se ha evitado la transferencia de precipitados a la columna de centrifugación de ADN MinElute). Compruebe que la temperatura ambiente no sea inferior a 15 °C durante la manipulación para evitar que los tampones se cristalicen. Compruebe las condiciones de transporte y almacenamiento.
Repita todo el flujo de trabajo. |
| e) Inversión de tubos de tiras y/o ID de muestra | Compruebe el esquema de pipeteo, que haya un tubo vacío en la posición correcta y que la configuración de la reacción sea correcta. Repita la serie de PCR. |
| f) Mala calidad de la muestra de ADNg | Repítala con más material. Se pueden usar hasta 1000 ng de entrada de ADN, medida con un método de OD de 260 nm. |
| g) Cierre del tubo ineficaz | El tubo no se ha tapado eficazmente, lo que causa evaporación durante la serie de qPCR. |
| h) No se ha cargado la muestra | Asegúrese de que la mezcla se haya cargado en ambos pocillos. |

Muestra no válida debido a "PMR delta alta"

- | | |
|---|---|
| a) Degradación de la mezcla de reacción | Almacene el contenido del kit entre -30 °C y -15 °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. Repita la serie de 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 4 µl de control/muestra y un volumen de 16 µl de mezcla de reacción de qPCR. Realice una inspección visual de todos los volúmenes pipeteados.
Compruebe las pipetas y, si es necesario, vuelva a calibrarlas 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 serie de PCR. |
| d) Curva de amplificación posiblemente incorrecta | Revise el diagrama de amplificación correspondiente en busca de curvas inusuales.
Vuelva a repetir con la muestra no válida. |

Comentarios y sugerencias

- | | |
|--|---|
| e) Señal atrasada debido a una cantidad baja que produce resultados de MPR más variables | Repítala con más material. Se pueden usar hasta 1000 ng de entrada de ADN, medida con un método de OD de 260 nm. |
| f) Mezcla insuficiente de las muestras de control | La descongelación del control no se completó antes de la carga o el mezclado de los controles con la mezcla de reacción (pipeteo hacia arriba y abajo) no se realizó correctamente. Repita la serie de PCR. |
| g) Cierre del tubo ineficaz | El tubo no se ha tapado eficazmente, lo que causa evaporación durante la serie de qPCR. |

Muestra no válida debido a "una repetición no válida"

- | | |
|--|---|
| a) No hay material suficiente (cerca del límite) | Repítala con más material. Se pueden usar hasta 1000 ng de entrada de ADN, medida con un método de OD de 260 nm. |
| 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 4 µl de control/muestra y un volumen de 16 µl de mezcla de reacción de qPCR. Realice una inspección visual de todos los volúmenes pipeteados.
Compruebe las pipetas y, si es necesario, vuelva a calibrarlas 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 serie de PCR. |
| d) Curva de amplificación posiblemente incorrecta | Revise el diagrama de amplificación correspondiente en busca de curvas inusuales.
Repita la serie de PCR. |
| e) Mezcla insuficiente de las muestras de control | La descongelación del control no se completó antes de la carga o el mezclado de los controles con la mezcla de reacción (pipeteo hacia arriba y abajo) no se realizó correctamente. Repita la serie de PCR. |
| f) Cierre del tubo ineficaz | El tubo no se ha tapado eficazmente, lo que causa evaporación durante la serie de qPCR. |
| g) No se ha cargado un pocillo de los dos pocillos para muestras | Asegúrese de que la mezcla se haya cargado en ambos pocillos. |

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. |
|---|---|

Control de calidad

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se analiza en cuanto a 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. El rendimiento del sistema se ha establecido empleando solamente tejidos de cáncer de mama incluidos en parafina y fijados en formol (FFPE).

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR solo se ha validado para tejido FFPE procedente de pacientes con cáncer de mama negativos para HER2, positivos para receptores de estrógeno y positivos para ganglios linfáticos de alto riesgo.

Este producto solo lo deben usar usuarios cualificados, como técnicos y médicos que hayan recibido formación en técnicas de biología molecular y en procedimientos de diagnóstico in vitro.

Este kit debe utilizarse de acuerdo con las instrucciones recogidas en este manual de uso, junto con equipos validados especificados en "Materiales requeridos pero no suministrados", en la página 12.

Todos los reactivos suministrados con el kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo kit.

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

El kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR solo se ha validado para su uso con solución de desparafinización (n.º de ref. 19093), xileno-etanol o histolemon-etanol, el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n.º de ref. 60404) y el kit EpiTect Fast DNA Bisulfite (n.º de ref. 59824 o 59826).

Solo se ha validado el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (para PCR).

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

Todos los diagnósticos deben realizarse en combinación con otros resultados clínicos o de laboratorio.

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

Características de rendimiento

En los casos en los que se han usado muestras biológicas para los estudios de esta sección, el paso de desparafinización anterior a la extracción de ADN_g se ha realizado empleando solución de desparafinización de QIAGEN. No obstante, tenga en cuenta que se ha mostrado la equivalencia entre la solución de desparafinización y el xileno o histolemon.

Límite de blanco

El límite de blanco (LoB) se ha determinado a partir de los puntos de datos que corresponden al percentil inferior y superior del 95 % de los resultados obtenidos con muestras cuya MPR es 0 y 100, respectivamente, como se describe en CLSI/NCCLS EP17-A2 (14). Las muestras analizadas corresponden a muestras artificiales generadas con números de copias distintos (100, 200, 500 y 750 copias) de plásmido no diana (diana de la otra sonda) en un fondo de ADN_g no convertido. Los resultados del LoB se basan en 64 y 63 mediciones para las sondas que establecen como diana secuencias metiladas anteriores, así como 64 y 61 mediciones para las sondas que establecen como diana secuencias no metiladas anteriores, por cada lote y con lotes piloto de kits distintos. Los resultados del LoB se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los resultados del límite de blanco

	Muestras con PMR 0		Muestras con PMR 100	
	LoB medido, PMR	LoB final, PMR	LoB medido, PMR	LoB final, PMR
Lote 1	0		99	
Lote 2	0	0	98	98

Límite de detección

Si se sigue el enfoque del método Probit descrito en CLSI/NCCLS EP17-A2 (14), el límite de detección (LoD) es el valor de PMR en el que el 95 % de las mediciones superan el LoB. El LoD se ha determinado para cada sonda en la entrada de ADN_g mínima de 200 ng y en la entrada de ADN_g recomendada de 400 ng empleando dos lotes piloto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR distintos. Se usaron tres muestras por cada entrada analizada (200 ng y 400 ng) y para cada sonda. Estas muestras se produjeron en números de copias amplificables totales, es decir, 50, 100 y 150 copias para una entrada de ADN_g de 200 ng y 100, 200 y 300 copias para una entrada de ADN_g de 400 ng. Por tanto, se produjeron 60 muestras en total para el estudio del LoD. Las muestra analizadas corresponden a muestras artificiales producidas a partir de mezclas de plásmidos diana y no diana (con cinco niveles de PMR teóricos distintos por muestra) en un fondo de ADN_g no convertido. Con cada sonda analizada en cada entrada, los resultados de LoD se obtienen a partir de al menos 20 mediciones por cada lote piloto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR para cada nivel de PMR de cada muestra. El LoD para muestras con MPR baja es 4 y para muestras con PMR alta es 92 (Tabla 9).

Tabla 9. Resumen de los resultados del límite de detección

Muestra	Cantidad de muestra (ng)	Lote	Valor de LOD	Límite inferior	Límite superior
Muestra con PMR baja	200	Lote 1	3	3	5
	200	Lote 2	3	3	4
	400	Lote 1	3	2	6
	400	Lote 2	4	3	6
Muestra con PMR alta	200	Lote 1	92	92	92
	200	Lote 2	> 92	N/D	N/D
	400	Lote 1	94	93	95
	400	Lote 2	95	93	95

N/D: No aplicable.

Introducción de ADN

Se analizaron cinco entradas de ADNg distintas (50, 100, 200, 400 y 1000 ng), cada una con siete niveles de PMR distintos (0, 5, 10, 25, 40, 50 y 75). La entrada de ADNg máxima se definió en 1000 ng por motivos técnicos, ya que una cantidad mayor sería difícil de obtener en una situación real. El rango de entrada de ADNg aceptable para el kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se determinó mediante la regresión de Deming, empleando un lote piloto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR y un equipo Rotor-Gene Q MDx.

El estudio mostró lo siguiente:

- La entrada de ADNg recomendada para utilizarse con el kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR es de 400 ng de ADNg
- La entrada de ADNg mínima aceptable es de 200 ng y la entrada de ADNg máxima es de 1000 ng.
- La entrada de ADNg mínima se debe analizar solamente si la entrada recomendada no puede alcanzarse, ya que aumenta el riesgo de obtener un resultado no válido debido a una entrada baja, haciendo así muy probable la necesidad de repetir la prueba. Se recomienda analizar la entrada de ADNg máxima cuando una entrada de ADNg de 400 ng produce un resultado de PMR no válido debido, por ejemplo, a un indicador de entrada baja.

Linealidad

El estudio de linealidad se llevó a cabo en cumplimiento de CLSI/NCCLS EP6-A (15). La linealidad del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se determinó con siete muestras en niveles distintos de PMR (0, 5, 10, 25, 40, 50 y 75), preparadas a partir de cinco entradas de ADNg distintas (200, 400 y 1000 ng incluidos). El estudio se realizó utilizando un lote piloto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR en un instrumento Rotor-Gene Q MDx por parte de un operador. El estudio mostró que la linealidad se confirma con muestras cuya PMR se encuentra entre 5 y 50 en las entradas de ADNg aceptables (es decir, entre 200 y 1000 ng).

Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad y la reproducibilidad del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR se determinaron en el transcurso de un estudio de precisión en un solo centro y de un estudio de precisión multicéntrico, ambos llevados a cabo en cumplimiento de CLSI/NCCLS EP5-A3 (16); consulte la Tabla 10 y la Tabla 11. Los estudios de precisión se realizaron con tres muestras biológicas cuya PMR era muy baja, baja y alta (9, 16 y 77, respectivamente). En el estudio de precisión en un solo centro, las fuentes de variabilidad se evaluaron en 23 días de trabajo no consecutivos por parte de tres operadores que utilizaron tres lotes piloto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR distintos y tres equipos Rotor-Gene Q MDx. Se obtuvieron dos mediciones por muestra en cada serie. Se realizaron dos series idénticas cada día con al menos dos horas entre cada serie. El tiempo de ejecución de la serie ha variado a lo largo del día de trabajo, esperando al menos dos horas entre cada serie para introducir más aleatoriedad en las pruebas. El estudio de precisión multicéntrico se realizó en tres centros distintos, en los que un solo operador utilizó un solo lote piloto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR en un solo equipo Rotor-Gene Q MDx. Se obtuvieron cinco mediciones por muestra en cada serie. Se realizó una serie cada día en cada centro, alternando entre la mañana y la tarde.

Tabla 10. Resumen de los resultados del estudio de precisión en un solo centro

Muestra	Fuente de variabilidad (%)						Total
	Intraserie	Serie	Lote	Instrumento	Operador	Día	
PMR muy baja	12,29	4,20	0,00	12,54	0,00	9,49	20,39
PMR baja	19,99	0,00	0,00	3,09	0,00	8,04	21,76
PMR alta	3,90	0,00	0,00	0,00	0,00	1,64	4,23

Tabla 11. Resumen de los resultados del estudio de precisión multicéntrico

Muestra	Fuente de variabilidad (%)			Total
	Interserie	Día	Centro	
PMR muy baja	13,90	8,43	4,72	16,93
PMR baja	28,72	0,00	0,00	28,72
PMR alta	4,25	0,00	1,77	4,61

Sustancias interferentes

El estudio de sustancias interferentes se llevó a cabo en cumplimiento de CLSI/NCCLS EP7-A2 (17). La concentración final de cada sustancia empleada durante el flujo de preparación de la muestra se evaluó primero (teniendo en cuenta el efecto de dilución en cada paso). Partiendo de la relevancia de la concentración final de cada sustancia en el material inicial para el kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR (es decir, ADNbis), se analizaron todas las sustancias interferentes empleando un lote piloto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR. Los resultados no han mostrado ninguna influencia interferente de las sustancias empleadas durante el flujo de trabajo del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR (Tabla 12).

Tabla 12. Sustancias interferentes analizadas

Sustancia analizada	Volumen final analizado en 30 μ l
Solución de desparafinización	$1,4 \times 10^{-15}$
Histolemon	$2,10 \times 10^{-20}$
Etanol (96 %-100 %)	0,50
Solución de bisulfito	$7,2 \times 10^{-09}$
Tampón protector de ADN	$2,26 \times 10^{-10}$
Tampón BL	$3,44 \times 10^{-08}$
Tampón BW	0,1102
Tampón BD	0,002

Contaminación cruzada

Se evaluó la contaminación cruzada entre muestras negativas y positivas empleando un lote piloto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR y dos equipos Rotor-Gene Q MDx. Se analizaron seis condiciones empleando NTC y/o control negativo como muestras negativas, con o sin una muestra de ADNbis, generando una PMR baja como muestra positiva. Se evaluó la contaminación cruzada en el 1,3 %.

Periodo en uso

El periodo máximo entre la preparación de la placa y la ejecución de la serie de qPCR se determinó empleando un lote piloto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR y una muestra artificial generada a partir de plásmidos diana y no diana con una PMR media. El periodo de tiempo máximo aceptable es de 24 horas; no obstante, se recomienda ejecutar la serie de qPCR del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR lo antes posible tras preparar la placa (es decir, tras cargar todas las muestras que se van a analizar).

Validación clínica límite

Se realizó un análisis prospectivo para validar el límite clínico del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR con tejido FFPE de 145 pacientes con cáncer de mama negativos para HER2, positivos para receptores de estrógeno y positivos para ganglios linfáticos de alto riesgo. Las muestras incluidas en el estudio consistieron en tejido FFPE archivado que cumplía con los criterios siguientes:

- Cáncer de mama invasivo histológicamente confirmado
- Estadio del tumor primario pT1, pT2 y pT3
- Afectación de los ganglios linfáticos histológicamente confirmada (\geq N1)
- Quimioterapia basada en antraciclina antineoplásica posquirúrgica estándar
- Sin terapia de dosis densa
- Sin otra quimioterapia sistémica primaria (sin taxanos adicionales), excepto la terapia hormonal

Se midió la PMR en cada muestra empleando el formato final del kit y las instrucciones del manual de uso.

La supervivencia sin enfermedad (SSE) fue el criterio de valoración primario y se definió como el tiempo entre la cirugía primaria y el primer evento de SSE documentado. La fecha de la cirugía primaria se tomó como fecha inicial del seguimiento. Los eventos de SSE incluyeron la recidiva del cáncer (recidiva local o metástasis a distancia), neoplasias malignas secundarias que se consideran potencialmente mortales y la muerte por cualquier causa. En el caso de pacientes que murieron sin recidiva del cáncer, se aplicó el análisis de riesgos competitivos según Fine y Gray (13).

Se realizó el análisis para el tiempo de seguimiento de SSE censurado a los 10 años. Las curvas de supervivencia se calcularon según la función de incidencia (13). El valor límite predefinido de PITX2 con 12 de PMR mostró una diferenciación significativa desde el punto de vista estadístico entre los dos grupos de la SSE del criterio de valoración primario, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ (doble; valor alfa). Por tanto, la fase de metilación del promotor de PITX2, evaluada con el ensayo del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR ha mostrado un valor predictivo para la quimioterapia basada en antraciclina en pacientes con cáncer de mama negativos para HER2, positivos para receptores de estrógeno y positivos para ganglios linfáticos de alto riesgo.















Referencias

1. Basu, M., Roy, S.S. (2013) Wnt/ β -Catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3. *J Biol Chem.* **288**, 4355.
2. Chen, F., Chen F., Yao, H., et al. (2016) Suppressing Pitx2 inhibits proliferation and promotes differentiation of iHepSCs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **80**, 154.
3. Fung, F.K., Chan, D.W., Liu, V.W., Leung, T.H., Cheung, A.N., Ngan, H.Y. (2012) Increased expression of PITX2 transcription factor contributes to ovarian cancer progression. *PLoS One* **7**, e37076.
4. Lee, W-L., Chakraborty, P.K., Thévenod, F. (2013) Pituitary homeobox 2 (PITX2) protects renal cancer cell lines against doxorubicin toxicity by transcriptional activation of the multidrug transporter ABCB1. *Int. J. Cancer* **133**, 556.
5. Xu, J., Prospero, J.R., Choudhury, N., Olopade, O.I., Goss, K.H. (2015) β -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS One* **10**, e0117097.
6. Lee, W-K., Thévenod, F. (2016) Upregulation of the multidrug resistance P-glycoprotein ABCB1 by transcription factor pituitary homeobox 2 (Pitx2) in human colon and kidney cancers. *FASEB J.* **30** (suplemento n.º 1), 439.2.
7. Maier, S., Nimmrich, I., Koenig, T., et al. (2007) DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients-Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group. *Eur. J. Cancer* **43**, 1679.
8. Harbeck, N., Nimmrich, I., Hartmann, A., et al. (2008) Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA-methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5036.

9. Hartmann, O., Spyrtos, F., Harbeck, N., et al. (2009) DNA-methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 315.
10. Lesche, R., Martens, J.W.M., Maier, S., et al. (2009) Identification of novel DNA-methylation markers predicting outcome in node-positive, anthracycline-treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **100** (suplemento), A6009.
11. Foekens, J., Harbeck, N., König, T., et al. (2011) Prognostic markers for prediction of treatment response and/or survival of breast cell proliferative disorder patients. European Patent 2011; EP 1 561 821 B1.
12. Aubele, M., Schmitt, M., Napieralski, R., et al. (2017) The predictive value of PITX2 DNA methylation for high-risk breast cancer therapy: current guidelines, medical needs, and challenges. *Disease Markers*. ID de artículo 4934608.
13. Fine, J.P., Gray, R.J. (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J. Am. Stat. Assoc.* **94**, 496.
14. 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 (anteriormente, NCCLS).
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2003). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; approved Guideline, first edition. CLSI Document EP6-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014). Evaluation of Precision of Quantitative Procedures; Approved Guideline, third edition. CLSI Document EP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente, NCCLS).
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente, NCCLS).

Símbolos

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

Símbolo	Definición del símbolo
	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Marcado CE de conformidad europea
	Número de referencia
	Número de lote
	Número de material
	Número mundial de artículo comercial
	Limitación de temperatura
	Revisión del manual, donde "n" es el número de revisión
	Fabricante
	Consultar las instrucciones de uso
	Mantener alejado de la luz solar
	Precaución

Información de contacto

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

Información para pedidos

Producto	Índice	N.º de referencia
Kit <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR: para la determinación de la relación porcentual de metilación (PMR) en el promotor 2 de PITX2		
<i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit (8)	Para 8 reacciones: Mezcla maestra de PITX2 RGQ PCR, mezcla de sonda para cebador PITX2 RGQ PCR, referencia 50 de PITX2 RGQ PCR, referencia baja de PITX2 RGQ PCR, control negativo de PITX2 RGQ PCR y NTC de PITX2 RGQ PCR	873211
Plataforma, software y accesorios de Rotor-Gene Q MDx		
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	Índice	N.º de referencia
Rotor-Gene AssayManager v2.1	Software para la realización de pruebas rutinarias en combinación con los equipos Rotor-Gene Q y Rotor-Gene Q MDx.	9024203
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloque de aluminio para preparación manual de reacciones con una pipeta monocanal en 72 tubos de 0,1 ml	9018901
72-Well Rotor	Para almacenar tubos de tiras y tapones 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 1000 reacciones	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapas para 10 000 reacciones	981106
Productos relacionados		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: 50 columnas QIAamp MinElute, proteinasa K, tampones, tubos de recogida	60404
Deparaffinization Solution (16 ml)	Solución de desparafinización de 16 ml	19093

Producto	Índice	N.º de referencia
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (200)	Para 200 conversiones de ADN: Solución de bisulfito, tampón protector de ADN, columnas de centrifugación de ADN MinElute, ARN portador y tampones	59826
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (50)	Para 50 conversiones de ADN: Solución de bisulfito, tampón protector de ADN, columnas de centrifugación de ADN MinElute, ARN portador y tampones	59824

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit QIAGEN correspondiente. Los manuales y los manuales del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al Servicio técnico de QIAGEN o al distribuidor local.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

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.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAxpert®, EpiTect®, MinElute®, *therascreen*®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (grupo QIAGEN); FAM™, HEX™, NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific Inc.); TaqMan® (grupo Roche).

Acuerdo de licencia limitada para el manual de uso del kit *therascreen* PITX2 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 los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el panel. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para otros usuarios. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este panel ni su(s) uso(s) no infrinjan derechos de terceros.
3. Este panel y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del panel 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 los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual con relación a este panel y con sus componentes.

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

Nov-17 HB-2370-001 © 2017 QIAGEN, reservados todos los derechos.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Asistencia técnica support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com