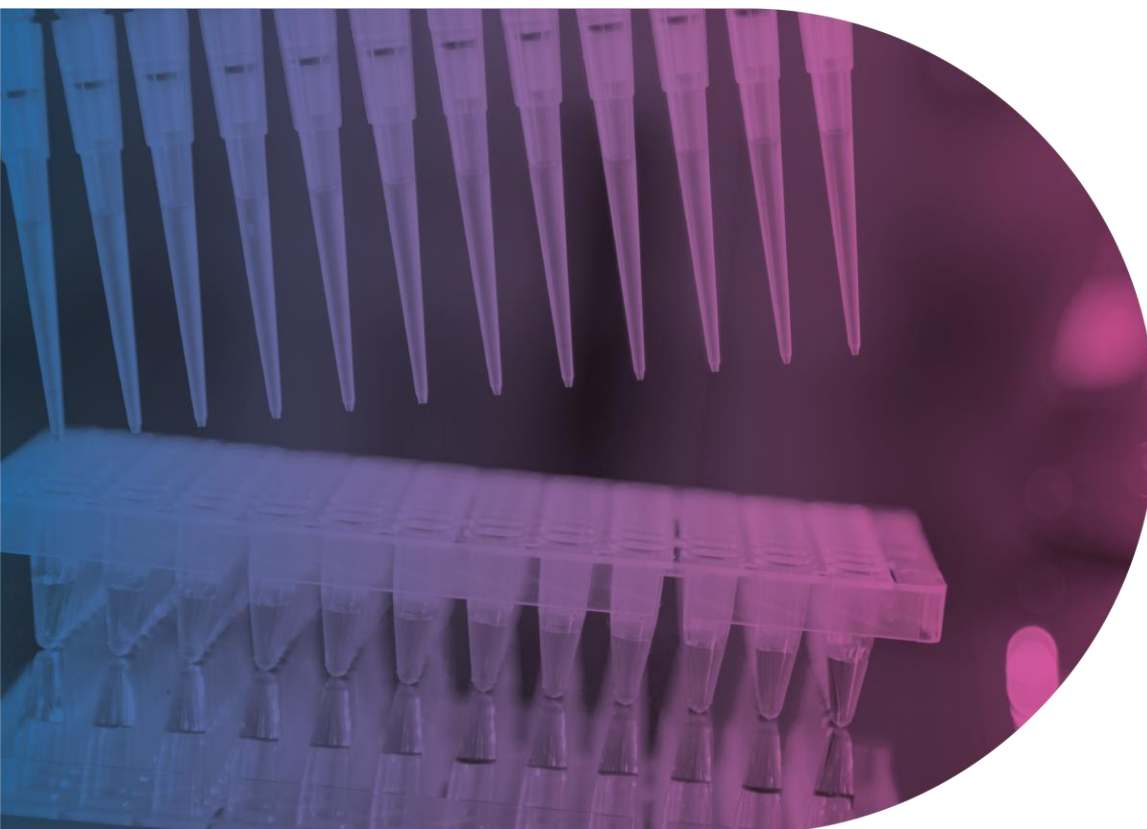




imegen



# Instrucciones de uso

Imegen<sup>®</sup> CALR

**REF** IMG-237

Fabricado por:  
Instituto de Medicina Genómica SL  
Agustín Escardino 9,  
Parc Científic de la Universitat de València  
46980 Paterna (Valencia, España)  
+34 963 212 340 - info@imegen.es

[imegen.es](http://imegen.es)

Rev. 3. 25/06/2018



AEMPS (Nº 2019 09 0061 EN)



Página 1 de 15



# imegen

Imegen le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

**Nuestros productos están diseñados para diagnóstico *in vitro*.** Imegen no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de imegen, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos.

Imegen no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. **imegen-CALR** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

**Teléfono:** 963 212 340

**e-Mail:** [tech.support@imegen.es](mailto:tech.support@imegen.es)

\***imegen**<sup>®</sup> es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España

<b>Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)</b>	
Versión 03	Cambio introducido: Adaptación a los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i> .



# imegen

## Índice

<b>1. Información general</b>	4
<b>2. Uso previsto</b>	5
<b>3. Características técnicas</b>	5
<b>4. Advertencias y precauciones de seguridad</b>	6
<b>5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit</b>	7
<b>6. Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran</b>	8
<b>7. Protocolo de ensayo</b>	9
7.1 Preparación de las reacciones de amplificación	9
7.2 Preparación de la placa de fragmentos	10
7.3 Electroforesis capilar	10
<b>8. Análisis de los resultados</b>	12
<b>9. Troubleshooting</b>	13
<b>10. Limitaciones</b>	15
10.1 Equipos	15
10.2 Reactivos	15
10.3 Estabilidad del producto	15



**imegen**

## 1. Información general

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) son un tipo de cáncer crónico de la línea mieloide en el que existe una sobreproducción de precursores de células sanguíneas en un estado avanzado de maduración. En dos subtipos de estas neoplasias, la trombocitemia esencial y la mielofibrosis primaria, el gen de la calreticulina (CALR) (NM\_004343.3) se encuentra mutado en alrededor de un 70-88% de los casos no afectados por mutaciones en el gen JAK2, el cual es el principal evento oncogénico de este tipo de neoplasias.

El gen CALR es un gen altamente conservado que produce una proteína que se puede hallar en muy diversas localizaciones subcelulares y que es capaz de unir cationes  $Ca^{2+}$ . Su mutación se produce mediante inserciones y deleciones en el exón 9, las cuales alteran el marco de lectura y producen un extremo C-terminal de la proteína alternativo. Estas mutaciones se han asociado con dos desórdenes hematológicos: las trombocitemias esenciales y las mielofibrosis primarias.

### Referencias

- Klampfl, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 369, 2379–90 (2013).
- Nangalia, J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* 369, 2391–405 (2013).



# imegen

## 2. Uso previsto

Mediante el uso del kit **imegen-CALR** se pueden analizar las inserciones/delecciones (INDELs) en el gen CALR, mediante PCR y posterior electroforesis capilar.

Los productos de PCR serán separados por electroforesis capilar, y serán detectados mediante el marcaje 6-Carboxifluoresceína (6-FAM).

**imegen-CALR** es sólo para uso diagnóstico in vitro y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

## 3. Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando muestras de biobanco, muestras previamente diagnosticadas por otros laboratorios con otras tecnologías y plásmidos sintéticos fabricados a partir de la secuencia de referencia, con tres variantes mutacionales y cuyo control de calidad proporciona las secuencias específicas incluidas en los vectores.

El material necesario para este estudio es ADN genómico procedente, principalmente, de sangre periférica. La cantidad total de ADN necesario es 50 ng.

Siguiendo el protocolo especificado en la Sección 7 (Protocolo de Ensayo) se ha establecido el límite de detección (LOD) en un 5%.

Imegen está certificada frente a la norma **UNE-EN ISO 13485:2018 Productos Sanitarios: Sistemas de Gestión de Calidad – Requisitos para fines reglamentarios** por la AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS para el Diseño, desarrollo y producción de productos sanitarios para diagnóstico in vitro:

- Kits de análisis genético
- Software para análisis bioinformático de datos genéticos



**imegen**

## 4. Advertencias y precauciones

1. Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
2. No pipetear con la boca.
3. No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
4. Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
5. No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
6. En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
7. Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
8. Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
9. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
10. Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.
11. El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por imegen.
12. El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por imegen, por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.



**imegen**

## 5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 33 determinaciones mediante los siguientes reactivos:

- CALR Master Mix: Se trata de un master mix de PCR con los oligonucleótidos específicos, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- Taq: Enzima necesaria para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- Positive control: Mezcla equimolar de ADNs plasmídicos en la que está presente un alelo normal, un alelo con inserción y dos alelos delecionados.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
CALR Master Mix	Disco Blanco	2x408 µl	-20°C
Taq	Disco Amarillo	25 µl	-20°C
Positive Control	Tapa Blanca	33 µl	-20°C

Tabla 1. Componentes del kit imegen-CALR



**imegen**

## 6. Equipos, reactivos y materiales no suministrados

### Equipos:

- Termociclador
- Micropipetas de 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L
- Vortex
- Centrífuga
- Equipo de electroforesis capilar

### Reactivos:

- GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystems cat. no. 4322682)
- Hi-Di™ formamide
- Agua libre de nucleasas

### Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Tubos de 0.2 mL
- Placas de 96 pocillos compatibles con el equipo de electroforesis capilar
- Film para placas de 96 pocillos
- Guantes de látex

Nota: Este kit no incluye los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo la electroforesis capilar.

### 6.1 Kits complementarios

Para el diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas, imegen también ofrece el kit por PCR a tiempo real, imegen-MPL (ref IMG-236).



## 7. Protocolo de ensayo

### 7.1 Preparación de las reacciones de amplificación

El kit **imegen-CALR** está diseñado para realizar una reacción de PCR por cada muestra que se desea analizar. Además, se recomienda analizar en cada tanda de amplificación un control negativo para descartar la presencia de contaminación en los reactivos de PCR y un control positivo.

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

A continuación, se muestra el protocolo recomendado para la preparación de las reacciones de amplificación:

1. Descongelar el tubo de CALR Master Mix, el control positivo y el ADN de las muestras. Agitar en vortex cada uno de los reactivos y mantener en frío.
2. En un tubo de 1,5 mL preparar el mix de reacción añadiendo 22.5 µL de CALR Master Mix y 0.5 µL de Taq por cada una de las muestras o controles. Agitar en vortex y dar un spin.
3. En un tubo de 0.2 mL dispensar 23 µL del mix de PCR. Dispensar tantos tubos de 0.2 mL como número de muestras o controles se vayan a analizar simultáneamente.
4. En los correspondientes tubos de 0.2 mL, añadir 2 µL de las muestras, previamente diluidas a una concentración de 25 ng/µL, 2 µL de agua libre de nucleasas en lugar de ADN en el control negativo de PCR y 2 µL del control positivo.
5. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de amplificación:
  - Programa óptimo:

Parámetros	Etapa 1	Etapa 2			Etapa 3	
Nº de Ciclos	1x ciclos	30x ciclos			1x ciclos	
		Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Extensión final y conservación	
Temperatura	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	5 minutos	1 minuto	1 minuto	2 mins	10 minutos	∞

Tabla 2. Programa de PCR óptimo para los equipos T3 de Biometra, SimpliAmp Thermal Cycler y GENEAMP® PCR System 2720 de Applied Biosystems

Es posible detener el protocolo en este punto. Los productos de PCR pueden almacenarse a 4°C si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas o a -20°C para periodos de tiempo superiores.



## 7.2 Preparación de la placa de fragmentos

Para llevar a cabo la electroforesis capilar, hay que preparar los productos de PCR (fragmentos) en una placa de 96 pocillos compatible con el equipo de electroforesis capilar, tal y como se indica a continuación:

1. Añadir a un tubo de 1.5 mL los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad por reacción
Formamida	18 $\mu$ L
Marcador GeneScan™ 500 LIZ	0.5 $\mu$ L

En caso de haber más de una reacción, se incrementará un 10% el volumen de cada reactivo.

Nota: El volumen del marcador de tamaño puede ser aumentado o disminuido para ajustar la intensidad de los picos observados en el electroferograma.

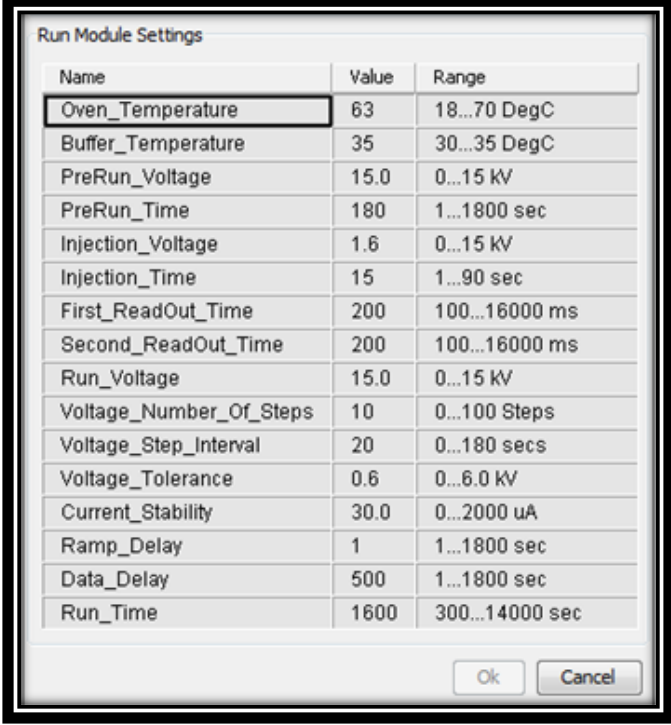
2. Dispensar 18.5  $\mu$ L de la mezcla anterior en cada pocillo.
3. Añadir 1  $\mu$ L del ADN obtenido en las reacciones de PCR.  
Nota: El volumen de muestra puede ser aumentado o disminuido (diluyendo las muestras con agua libre de nucleasas) para ajustar la intensidad de los picos observados en el electroferograma.
4. Sellar la placa con un film, dar un spin y desnaturalizar en un termociclador durante 5 minutos a 98°C.
5. Guardar a 4°C la placa hasta el momento de introducirla en el equipo de electroforesis capilar.

## 7.3 Electroforesis capilar

Una vez preparada la placa de fragmentos, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Dependiendo del modelo de secuenciador utilizado, se emplearán las condiciones de electroforesis recomendadas por el fabricante.

Para programar estas condiciones se tendrá en cuenta que el rango de amplificación varía aproximadamente entre 100-500 pb, que se emplean cebadores marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScan™ 500 LIZ.

A continuación se muestra una imagen con las condiciones optimizadas para el secuenciador 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific), usando el polímero POP-7™.



Name	Value	Range
Oven_Temperature	63	18...70 DegC
Buffer_Temperature	35	30...35 DegC
PreRun_Voltage	15.0	0...15 kV
PreRun_Time	180	1...1800 sec
Injection_Voltage	1.6	0...15 kV
Injection_Time	15	1...90 sec
First_ReadOut_Time	200	100...16000 ms
Second_ReadOut_Time	200	100...16000 ms
Run_Voltage	15.0	0...15 kV
Voltage_Number_Of_Steps	10	0...100 Steps
Voltage_Step_Interval	20	0...180 secs
Voltage_Tolerance	0.6	0...6.0 kV
Current_Stability	30.0	0...2000 uA
Ramp_Delay	1	1...1800 sec
Data_Delay	500	1...1800 sec
Run_Time	1600	300...14000 sec

Figura 1. Parámetros optimizados para el secuenciador 3730xl DNA

La intensidad en la detección puede variar entre los distintos equipos, dependiendo del modelo, del estado del sistema óptico del equipo y del tiempo y voltaje de inyección. Por ello, puede ser necesario, aumentar o disminuir la cantidad de marcador de tamaño o de producto de PCR requeridos para llevar a cabo la electroforesis capilar.



## 8. Análisis de resultados

El análisis de los resultados se lleva a cabo con un programa específico para el análisis de fragmentos y el fichero resultante de la electroforesis capilar. El resultado será un electroferograma con picos con una intensidad determinada (altura) y a una distancia directamente proporcional al tamaño del fragmento (ver figura 2).

A continuación se muestra una imagen con ejemplos de posibles resultados.



Figura 2. Resultados de PCR. **A** Perfil de una muestra de ADN procedente de un donante libre de enfermedad (232 pb). **B y C** Perfiles de tres muestras de ADN procedentes de pacientes con las dos mutaciones más frecuentes en CALR (inserción de 5 pb y delección de 52 pb respectivamente).

A continuación se muestra una imagen como ejemplo del resultado obtenido para el control positivo, y su tamaño en pares de bases. En dicho control se encuentran presentes cuatro alelos: alelo normal (no mutado), una inserción de 5 pb (c.1154-1155insTTGTC), una delección de 52 pb (c.1092-1143del) y una delección de 1 pb (c.1122del) según el NM\_004343.3.

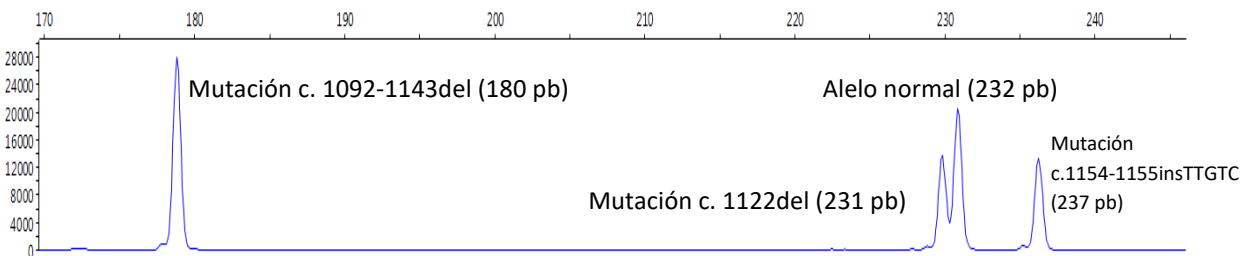


Figura 3. Electroferograma obtenido del control positivo



## 9. Troubleshooting

La tabla siguiente representa los resultados que podrían ser obtenidos en las muestras analizadas, el control positivo, el marcador de tamaño y el control negativo. En caso de obtener un resultado inesperado, la interpretación y la razón más probable de dicho resultado se muestran en la siguiente tabla.

Problema	Muestras analizadas	Control Positivo	Marcador de tamaño	Control negativo	Resultados / Interpretación
Señal de fluorescencia débil o nula				√	Resultado esperado
	√			√	Cantidad y/o calidad del ADN molde insuficiente <sup>1</sup> ADN molde impuro <sup>2</sup>
	√	√	√	√	Fallo en la electroforesis capilar <sup>3</sup> Fallo en la desnaturalización <sup>4</sup>
	√	√		√	Fallo en la PCR <sup>5</sup>
Señal de fluorescencia excesiva	√				Cantidad excesiva de ADN <sup>6</sup>
	√	√			
Presencia de más picos de los esperados		√		√	Contaminación <sup>7</sup>

Tabla 3. Interpretación de los posibles resultados con el kit imegen-CALR

- 1 Cantidad y/o calidad de ADN molde insuficiente:** Comprobar que el ADN ha sido correctamente cuantificado y usar la cantidad indicada de ADN molde. En caso de que el ADN haya sido correctamente cuantificado, comprobar su integridad y llevar a cabo una nueva extracción si es necesario.
- 2 ADN molde impuro:** Altas concentraciones de sales o un pH alterado pueden inhibir la PCR. Si usa un ADN molde disuelto en un tampón de elución con un pH diferente de 8 o con concentraciones altas de EDTA, el volumen de ADN no debería exceder el 20% del volumen total de la reacción. Restos de los reactivos usados durante la extracción también pueden afectar a la reacción de PCR. Si es así, limpie el ADN o prepare una nueva extracción.
- 3 Fallo en la electroforesis capilar:** Revise si los parámetros del equipo son los especificados y reinyecte las muestras.
- 4 Fallo en la desnaturalización:** Para una correcta desnaturalización las muestras deben ser calentadas el tiempo indicado en el apartado 7 de estas instrucciones de uso, y posteriormente mantener en frío hasta la carga en el secuenciador.



# imegen

- <sup>5</sup> **Fallo en la PCR:** Compruebe que el programa de PCR es el indicado.
- <sup>6</sup> **Cantidad excesiva de ADN:** Asegúrese de estar usando la cantidad adecuada de ADN. Si es así, diluya el producto de PCR en agua estéril desionizada y prepare de nuevo la desnaturalización y carga en el secuenciador.
- <sup>7</sup> **Contaminación:** Puede ser producida por otro ADN molde o por un ADN previamente amplificado. La contaminación cruzada puede dar lugar a falsos positivos y negativos, derivando todo ello en problemas en la interpretación de los resultados. Use puntas de pipeta con filtro y cambie los guantes regularmente.



**imegen**

## 10. Limitaciones

### 10.1 Equipos

**imegen-CALR** ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific)
- GeneAmp PCR System 2720 (ThermoFisher Scientific)
- T3000 Thermocycler 48 (Biometra)

Si usa otra marca o modelo de termocicladores, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro servicio técnico para cualquier consulta o aclaración.

**imegen-CALR** ha sido validado usando la siguiente plataforma de secuenciación:

- 3730xl DNA Analyzer (ThermoFisher Scientific)

Este kit es válido para los polímeros compatibles con el marcaje 6-Carboxifluoresceina (6-FAM). En caso de utilizar otro equipo diferente al mencionado anteriormente, seguir las especificaciones del protocolo de dichas plataformas.

### 10.2 Reactivos

**imegen-CALR** se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual (Equipos y materiales necesarios que no se suministran).

Para la electroforesis capilar se recomienda emplear los reactivos recomendados por el proveedor del secuenciador: ThermoFisher Scientific.

En caso de duda, por favor contacte con nuestro servicio técnico.

### 10.3 Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.