

7. ANEXOS

7.0. Anexo 0. Previo al desarrollo del producto.

Anexo 0.1. Normativa de comercialización

IVDR son las siglas de una regulación europea, la “Regulación sobre Productos Sanitarios para Diagnósticos in Vitro” también (EU) 2017/746. El reglamento se ocupa de regular la comercialización y puesta en servicio de los productos sanitarios que componen el grupo de los productos sanitarios para el diagnóstico in vitro en todo el territorio de la UE (109).

Los IVD vendidos en la UE requieren un marcado CE para certificar que el dispositivo cumple con la “Directiva Europea de Dispositivos de Diagnóstico In Vitro” (IVDD 98/79/EC). El marcado CE es una certificación de calidad que indica que el dispositivo puede comercializarse legalmente en la UE (110). A modo resumen, las directivas europeas son documentos legislativos, emitidos por el Parlamento Europeo y el Consejo de la UE, que establecen requisitos esenciales para los productos, con objeto de garantizar la seguridad y el bienestar de los ciudadanos europeos (111).

La **British standards institution, BSI**, es una multinacional con sede en Londres cuyos objetivos principales incluyen la certificación, auditoría y formación en las normas para estandarizar procesos. Forma parte de la organización internacional de normalización (ISO) y es proveedor de estas, entre las que destaca las ISO 9000 (gestión de calidad), ISO 14000 (gestión ambiental) e ISO 27000 (gestión de la seguridad de información) para las empresas. Además, es el encargado, entre otros, de conceder los marcados CE a aquellos productos que quieran ser comercializados.

Una de las principales mejoras de la nueva regulación (*Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro*), con respecto a la directiva de 1998, es que la clasificación de los IVD se realiza bajo “reglas basadas en riesgos” y no bajo una lista predeterminada de dispositivos. Las principales características de la nueva clasificación basada en riesgos son:

- Clase A: Bajo riesgo personal, bajo riesgo para la salud pública
- Clase B: Riesgo personal moderado a bajo, riesgo bajo para la salud pública
- Clase C: Alto riesgo personal, riesgo moderado a bajo para la salud pública
- Clase D: Alto riesgo para la salud pública, alto riesgo persona (112)

Esta clasificación se encuentra en el **Anexo VIII Reglas de Clasificación**. Este anexo incluye 2 secciones en las que se definen las normas de aplicación (sección 3.1) y las reglas de clasificación (sección 3.2). El kit de multiplexación para las mutaciones relacionadas con la HH se encuentra en la sección 3.2.3. *Regla 3* en la que se clasifican en la clase C los productos destinados a “i) la realización de pruebas genéticas humanas”, entre otros.

La imagen de la figura siguiente explica de forma más esquematizada las distintas clases de productos sanitarios en los que se pueden clasificar.

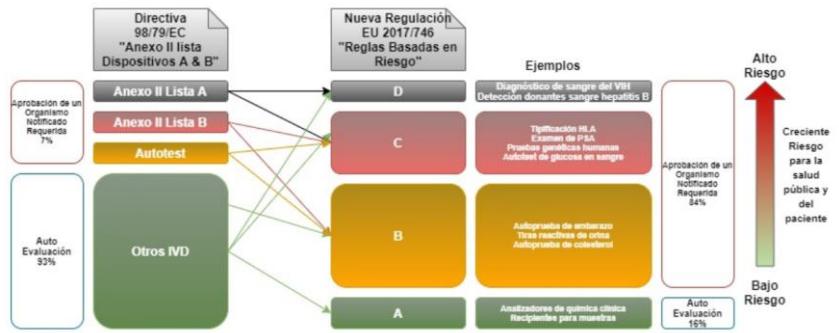


Figura 36. Clasificación de los productos sanitarios de diagnóstico *in vitro*. Izda. Clasificación con la directiva de 1998. Dcha. Nueva regulación EU 2017/746. La autoevaluación con la nueva regulación se ha reducido únicamente a los productos de tipo A. Se observa que, solamente, el 16% de los productos pueden llevar a cabo una autoevaluación ya sea porque no haya falta debido a la no nocividad de los productos o porque puedan ser autoevaluados. Actualmente el 84% de los IVD registrados requieren la participación de un Organismo Notificado, en el que entra el kit desarrollado por la empresa. Este aumento de la necesidad de ser aprobados por un organismo notificado aumenta la seguridad del producto comercializado.

<https://www.asebio.com/actualidad/prensa/clasificacion-de-diagnosticos-vitro-bajo-la-nueva-ivdr>

Anexo 0.2. Normas ISO

Las **normas ISO** son un conjunto de estándares con reconocimiento internacional que fueron creados con el objetivo de ayudar a las empresas a establecer unos niveles de homogeneidad en relación con la gestión, prestación de servicios y desarrollo de productos en la industria (113).

Como se ha mencionado en el *apartado 3.4.2. Validaciones del producto desarrollado*, la validación viene indicada por la norma ISO 17025 para laboratorios de ensayo, ISO 15189 para laboratorios clínicos y las buenas prácticas de laboratorio.

- La **Norma ISO 17025** proporciona los requisitos necesarios que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración facilitando la armonización de criterios de calidad. El objetivo principal de esta es garantizar la competencia técnica y la fiabilidad de los resultados analíticos. La norma contiene tanto requisitos de gestión como requisitos técnicos que inciden sobre la mejora de la calidad del trabajo realizado en los laboratorios. Estos requisitos son empleados como herramientas para la difusión de un conocimiento colectivo, que facilita la integración del personal, proporciona flexibilidad en la adaptación a cambios del entorno y permite detectar problemas para su resolución anticipada. Finalmente, la acreditación del laboratorio será el reconocimiento formal de la competencia y capacidad técnica para llevar a cabo análisis específicos (114).
- La **Norma ISO 15189** es el documento donde se indican los requisitos que los laboratorios clínicos deben seguir para poder acreditarse. Esta norma está basada en la ISO 17025 (referencia para la acreditación de los laboratorios de ensayo y de calibración) y en la ISO 9001 de gestión de calidad. La ISO 15189 incluye todos los requisitos que los laboratorios clínicos encargados de analizar las muestras biológicas de origen humano, deben cumplir para garantizar que disponen de un sistema de gestión de la calidad (115,116).

7.1. Anexo 1. Parámetros que influyen en la PCR

Anexo 1.1. Mezcla de reacción

Primers (cebadores, oligonucleótidos). Delimitan la zona de ADN a amplificar. Al ser reconocidos por la enzima permiten iniciar la reacción. Deben estar situados enfrentados y no a mucha distancia. Son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo. Normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN y la concentración a la que suelen emplearse está en el intervalo de 0,1-0,5 micromolar (μM). Existen diferentes programas computacionales (como ADNsis, Primer3 y Oligo) que ayudan en el diseño, cálculo de las T_m , estructuras secundarias y posibles interacciones.

ADN molde. Contiene la región de ADN que se va a amplificar. La cantidad de este molde puede ser de tan sólo 1 ng en caso de material genético clonado o de un mínimo de 20 ng cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. El molde puede ser también ARN previamente transformado en ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa.

dNTPs. Los cuatro dNTPs son los ladrillos para construir las nuevas cadenas de ADN. Variaciones en su concentración afectan especificidad y fidelidad. Concentraciones altas hacen disminuir la actividad de la enzima e incluso pueden llegar a inhibirla. El uso de concentraciones desbalanceadas también afecta la fidelidad, siendo las concentraciones utilizadas en la mayoría de los casos entre 0,2 a 1 mM. Los dNTPs pueden captar iones de magnesio (Mg^{2+}) por lo tanto las concentraciones de ambos deben guardar siempre la misma relación.

Iones divalentes y monovalentes. Los iones divalentes actúan como cofactores de la enzima por tanto tienen una función crítica en la reacción. Se suele usar Mg^{2+} , agregado comúnmente como MgCl_2 , requiriéndose que sea usado a una concentración que oscila regularmente entre 0,5 y 2,5 mM. En muchos casos la concentración debe optimizarse para cada ensayo. Entre los iones monovalentes el más empleado es el potasio (K), generalmente unido a otros iones como el cloro (Cl) en forma de KCl en una solución tampón.

Solución tampón (buffer). Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa. Por lo general incluye Tris-HCl (pH=8,4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y MgCl_2 . Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes los cuales en la práctica aumentarían especificidad y fidelidad. Entre los adyuvantes más empleados se señalan DMSO, detergentes como el Tween 20 o el Tritón X-100 que ayudan a estabilizar la enzima y finalmente polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida y seroalbúmina bovina.

Agua. Usada como solvente. Se requiere al menos que sea desionizada o milli-Q. Si se busca un mejor rendimiento se aconseja, además, que sea libre de DNases y RNases, purificada por luz ultravioleta, ozono o 0,1% de dietilpirocarbonato (este último inactiva las RNasa) (68).

Anexo 1.2. Parámetros de ciclo de la PCR

La PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura ($> 90^\circ\text{C}$), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Estos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y de los

dNTPs en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores, así como la longitud del ADN que se desea amplificar. A continuación, se mencionan las etapas que están involucradas en el proceso PCR (117).

1. **INICIO:** Consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 °C (o 98 °C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor.
2. **DESNATURALIZACIÓN:** En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos cadenas de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95 °C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de G y C que contenga la cadena, como también del largo de la misma.
3. **HIBRIDACIÓN O UNIÓN DEL CEBADOR, annealing:** A continuación, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.
4. **EXTENSIÓN O ELONGACIÓN DE LA CADENA:** En esta etapa actúa la polimerasa tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN.

La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP complementarios en dirección 5' → 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que se use. Para la polimerasa Taq, la temperatura de máxima actividad está en 75-80 °C (comúnmente 72 °C). El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. Hay una regla comúnmente usada: en su temperatura óptima, la polimerasa de ADN polymerizará mil bases en un minuto.

5. **ELONGACIÓN FINAL:** Se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.
6. **CONSERVACIÓN:** Este paso que se lleva a cabo a 4-15 °C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo.

7.2. Anexo 2. Diseño de sondas

Anexo 2.1. Componentes adicionales de las sondas: fluoróforos y quenchers

Un **fluoróforo**, por analogía con los cromóforos, es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente. Es un grupo funcional de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra longitud de onda diferente, pero igualmente específica. La cantidad de energía emitida y su longitud de onda dependen tanto del propio fluoróforo como de su ambiente químico (118).

Es una sustancia que se emplea para marcar anticuerpos u otras moléculas, por su propiedad de emitir luz de una determinada longitud de onda, cuando se le estimula con un láser o con luz ultravioleta (119).

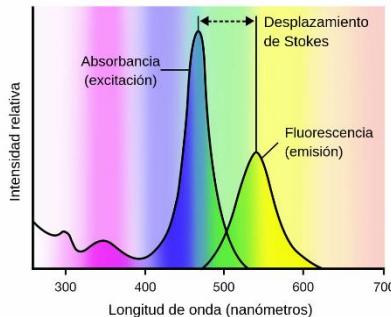


Figura 37. Perfil de espectros de emisión y excitación de los fluoróforos. Eje Y. Intensidad relativa. Eje x. Longitud de onda medida en nm. https://scian.cl/scientific-image-analysis/wp-content/uploads/2021/10/CCPGA_MIM_2014_M12.1_Grupo1_Prepaso-1_Fluorescencia.pdf

Los **quenchers** son sustancias capaces de absorber energía de un fluoróforo (como un colorante fluorescente) y volver a emitir gran parte de esa energía en forma de calor (en el caso de los extintores oscuros) o luz visible (en el caso de los extintores fluorescentes). BHQ es un ejemplo de quencher oscuro y TAMRA es un ejemplo de quenchers fluorescente.

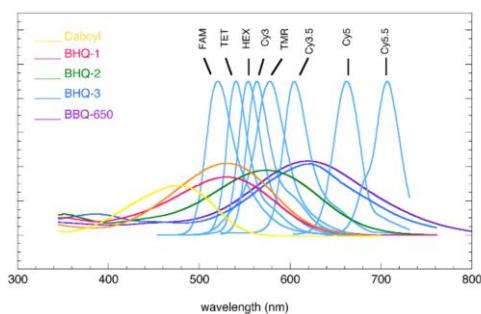


Figura 38. Espectros de fluorescencia de varios quenchers oscuros. Eje Y. Intensidad de fluorescencia. Eje X. Longitud de onda (nm). Quenchers - Introduction [Internet]. [cited 2022 Oct 23]. Available from: http://www.genelink.com/oligo_modifications_reference/OMR_mod_category_intro.asp?mod_sp_cat_id=15

Cuando el fluoróforo y el quencher están muy cerca, el quencher absorbe la energía emitida por un fluoróforo excitado, suprimiendo así su emisión. Cuando las dos sustancias están muy separadas, el quencher ya no puede absorber la emisión del fluoróforo y la presencia de este último puede detectarse visualmente. Estas propiedades se utilizan en muchas sondas de oligonucleótidos populares que se utilizan actualmente con fines de investigación o diagnóstico, como las sondas TaqMan. En tales sondas, un inhibidor y un fluoróforo que tienen espectros de absorción y emisión superpuestos, respectivamente, se incorporan a la sonda como un par. La sonda está diseñada de tal manera que el quencher y el fluoróforo siempre permanecerán muy cerca si el objetivo específico no está presente, y estarán muy separados si está presente. Por tanto, la observación de una señal fluorescente indica la presencia del objetivo, y la ausencia de una señal fluorescente indica la ausencia del objetivo (120).

Anexo 2.2. Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia de Förster, FRET

Förster o transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) es un mecanismo que describe la transferencia de energía entre dos moléculas sensibles a la luz (cromóforos). Un cromóforo donante, inicialmente en su estado de excitación electrónica, puede transferir energía a un cromóforo aceptor a través del acoplamiento dipolo-dipolo no radiactivo. Esta transferencia es un tipo de quenching llamado quenching externo en el que la energía de excitación se

transfiere a otra molécula. Típicamente por colisión o formación de complejos oscuros con la otra molécula quencher.

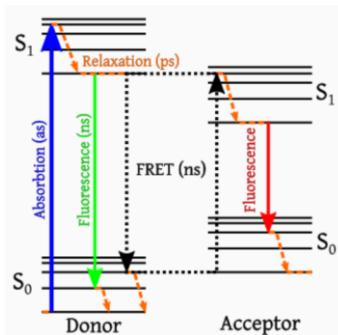


Figura 39. Mecanismos de Förster o transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Transferencia de energía de resonancia Förster Terminología y Bases teóricas [Internet]. [cited 2022 Oct 23]. Available from: https://hmong.es/wiki/Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer

La eficiencia de esta transferencia de energía es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre el donante y el acceptor, lo que hace que FRET sea extremadamente sensible a pequeños cambios en la distancia (121).

7.3. Anexo 3. Instrumentos de PCR en tiempo real, termocicladores

Un termociclador es un aparato usado en biología molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR o para reacciones de secuencia con el método de Sanger.

El modelo más común consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye una temperatura homogénea a través de una placa durante tiempos que pueden ser programables, normalmente con rangos de temperatura de 4 °C a 96 °C donde ocurre la desnaturación, hibridación y extensión de una molécula de ADN. Dado que las reacciones incubadas en el aparato son en soluciones acuosas, suelen incluir en la tapa una placa calentada constantemente a 103 °C para evitar la condensación del agua en las tapas de los tubos donde ocurre la reacción, y así evitar que los solutos se concentren, lo que modificaría las condiciones óptimas para la enzima polimerizante (Taq Polimerasa) y la termodinámica del apareamiento de los iniciadores conocidos como primers o cebadores (122).



Figura 11. Termociclador QS5DX, Applied biosystems. QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System - ES. [cited 2022 Oct 23]; Available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/clinical/diagnostic-testing/instruments-automation/genetic-analysisinstruments/quantstudio-5-dxreal-time-pcr-system.html>

7.4. Anexo 4. Parámetros de validación analítica

Anexo 4.1. Error sistemático y aleatorio

En estadística el **error sistemático** (SESGO) es aquel que se produce de igual modo en todas las mediciones que se realizan de una magnitud. Puede estar originado en un defecto del

instrumento, particularidad del operador o del proceso de medición...

En las disciplinas científicas, el **error aleatorio** o accidental es aquel error inevitable (AZAR) que se produce por eventos únicos imposibles de controlar durante el proceso de medición. Se contrapone al concepto de error sistemático.

Anexo 4.2. Medidas de dispersión

La **varianza** es una medida de dispersión que se utiliza para representar la variabilidad de un conjunto de datos respecto de la media aritmética de los mismo. Así, se calcula como la suma de los residuos elevados al cuadrado y divididos entre el total de observaciones (123).

El **coeficiente de variación** es una medida de dispersión que permite el análisis de las desviaciones de los datos con respecto a la media y al mismo tiempo las dispersiones que tienen los datos dispersos entre sí (124). Su cálculo se obtiene de dividir la SD entre el valor absoluto de la media del conjunto y por lo general se expresa en porcentaje para su mejor comprensión (125).

$$CV = \frac{\sigma_x}{|\bar{X}|}$$

Siendo la media y la SD una medida que se utiliza para cuantificar la variación o la dispersión de datos numéricos en una variable aleatoria, población estadística, conjunto de datos o distribución de una probabilidad. La SD es la raíz cuadrada de la varianza. Es decir, la raíz cuadrada de la media de los cuadrados de las puntuaciones de desviación (126,127).

Anexo 4.3. Precisión y exactitud de un método analítico

La **exactitud** es la capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo más cercanos posibles al valor verdadero. Expresa proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente. La **precisión**, por otra parte, es la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí, expresando el grado de dispersión de los resultados analíticos alrededor de su valor medio.

Es muy importante no confundir los parámetros de validación. Por ejemplo, cuatro analistas de un laboratorio han valorado la misma muestra cinco veces cada uno:

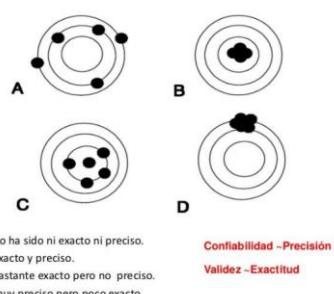


Figura 40. Comparación entre exactitud y precisión de las medidas.
http://cv.uoc.edu/UOC/a/moduls/90/90_166d/web/main/m4/31a.html

El primero es preciso porque la dispersión entre sus valoraciones es mínima, pero es poco exacto porque la media de sus resultados está alejada del valor verdadero. El quinto analista es preciso y exacto porque la media de sus resultados es cercana al valor verdadero y porque hay poca dispersión entre ellos. Lo mejor es ser preciso y exacto.

Anexo 4.4. Ensayo de reproducibilidad

La **reproducibilidad** hace referencia a la validación externa de laboratorios. En este caso, es necesario generar el método y definir el patrón. A nivel interno, en la validación no hay ninguna guía. Si hay algún método de referencia se usa, sino se empieza de cero. El uso previsto lo determinan los clientes. Las especificaciones y los requerimientos las dan terceros (100).

Anexo 4.5. Ensayo de repetibilidad

La **repetibilidad** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas en un mismo laboratorio y en un periodo corto de tiempo. Así se asegura de que variables como el tiempo o la temperatura no afectan al método. Forma parte de la validación interna.

7.5. Anexo 5. Espectros de fluorescencia de los fluoróforos Cy5, HEX, TexasRed y ROX

Anexo 5.1. Espectros de fluorescencia de los fluoróforos HEX, TexasRed y ROX

La figura a continuación muestra los espectros de excitación y absorción de los fluoróforos HEX, TexasRed y ROX. Se observa que el espectro de absorción del TexasRed se encuentra más cercano al espectro de emisión del fluoróforo HEX. De ahí que se observe una mayor interferencia al usar este fluoróforo que al usar el fluoróforo ROX que tiene menor solapamiento espectral.

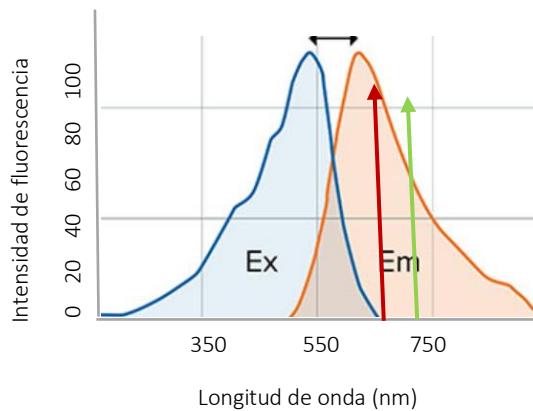


Figura 42. Espectro de excitación y emisión del fluoróforo HEX. En rojo se marca donde se encontraría el espectro de absorción del TexasRed y en verde el espectro de absorción del ROX. Eje Y. Intensidad de fluorescencia. Eje X. Longitud de onda (nm). <https://es.moleculardevices.com/technology/fluorescence>

Anexo 5.2. Genotipos e interferencia

Como ya se ha mencionado en el apartado 4.1.2. *Sustitución de fluoróforo TexasRed a ROX (genotipo mutados C282Y)* se produce un solapamiento del fluoróforo HEX en el canal TexasRed que se consigue eliminar con la sustitución de este fluoróforo TexasRed por el fluoróforo ROX. El solapamiento de HEX se observa ya que la inespecificidad observada en el canal de TexasRed de las muestras homocigotas wildtype C282Y únicamente ocurre en los genotipos que son, además, homocigotos wildtype H63D o heterocigotos H63D. Es decir, en aquellas muestras que el fluoróforo HEX amplifica. Las imágenes siguientes diferencian mejor este aspecto.

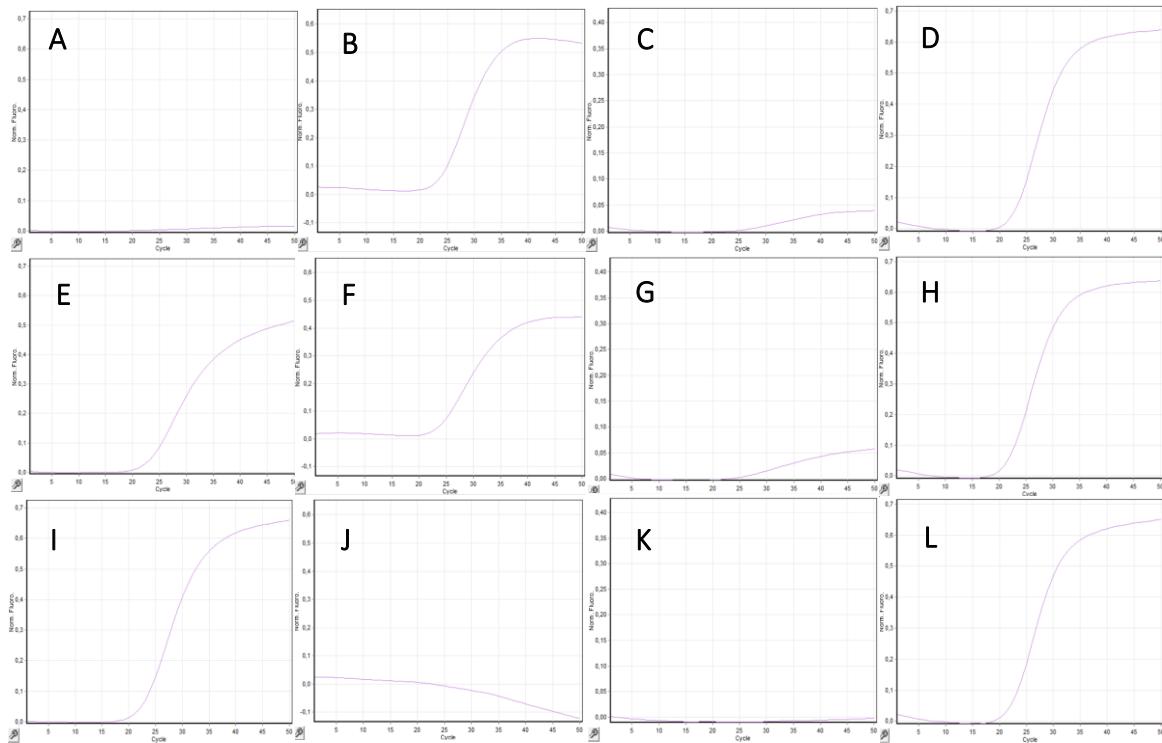


Figura 43. Curvas de amplificación de los canales donde se miden los 4 fluoróforos para las muestras estudiadas en el termociclador RG. A. Curvas de amplificación de la muestra homocigota wildtype H63D y homocigota wildtype C282Y. B. Curvas de amplificación de la muestra heterocigota H63D y homocigota wildtype C282Y. C. Curvas de amplificación de la muestra homocigota mutada H63D y homocigota wildtype C282Y. Eje Y. Medida de la fluorescencia como fluorescencia normalizada. Eje X. Número de ciclos.

7.6. Anexo 6. DFRAT Genvinset H63D-C282Y multiplex

Las imágenes de la figura a continuación son varias capturas del DRAFT enviado a los distintos laboratorios que han realizado las validaciones externas del kit.

6- Kit storage

All the components of the kit must be stored between -18°C and -30°C upon reception. Under these conditions the kit keeps its functionality until the expiry date indicated on the label. Do not perform more than 3 freeze/thaw cycles to the kit vials as this may reduce the sensitivity of the assay and affect the results. If assays are to be performed with few samples, it is recommended to separate the components into aliquots to reduce freeze/thaw cycles. Due to the photosensitive nature of the Primer Mix, avoid continuous exposure to light.

7- Materials required but not supplied

General

- Disposable gloves
- Lab coat

Consumables

- Filter tips (P200, P20 and P10)
- 15 mL autoclaved tubes
- Compatible consumables for each real time PCR instrument

Equipment

- Vortex mixer
- Centrifuge
- Micropipettes (P200, P20 and P10)
- Real time PCR instrument, with FAM, HEX/VIC, ROX and Cy5 detection channels. The following devices have been validated:
 - 7500, and QuantStudio Dx Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems™
 - LightCycler® 96 System, and LightCycler® 480, Roche
 - Rotor-Gene® Q, Qiagen®
 - DT Lite Real-Time PCR System, DNA-Technology
 - CFX Opus 96 Real-Time PCR, BioRad

1. Thaw all the kit components before starting the assay. Vortex vigorously the Primer Mix vials and mix carefully the Master Mix wells. Centrifuge briefly to collect the volume at the bottom of the tubes.
2. Prepare the following mix for n+1 samples, using the quantities indicated in the following table:

	Vol. per sample (µL)
Master Mix	10
Primer Mix	8

- Gently mix and centrifuge to ensure that all volume settles to the bottom of the tube.
3. Pipette 18 µL of this mix into the PCR plate/tubes.
 4. Add into each well 2 µL of DNA. Reaction Blank, Control C1 or C2.
 5. Seal the plate/tubes using the appropriate sealer and centrifuge briefly to ensure that all the volume settles to the bottom of the well.
 6. Place the plate/tubes in the thermal cycler and set up the thermal cycler amplification programme as described in the following section.

→ Thermal cycler configuration

1. Set up the following readout channels:
 - FAM channel for FAM-labelled H63D-mut probe detection
 - HEX/VIC channel for HEX-labelled H63D-wt probe detection
 - ROX channel for ROX-labelled C282Y-mut probe detection
 - Cy5 channel for Cy5-labelled C282Y-wt probe detection

2. Set up the following amplification program and start the run:

	Cycles	Temperature (°C)	Time (min:ss)	Analysis
Denaturation	1	95	05:00	X
		95	00:15	X
Cycles	50	64	01:00	Single
Cooling	1	15	∞	X

8- Sample collection and preparation

Specimens should be collected in accordance with collection device (not included) instructions for use and any international and national guidelines. The present test should only be performed with whole blood samples collected in EDTA or citrate anti coagulation agents. Heparin can interfere with the PCR process and should be avoided.

The technique is compatible with several DNA extraction methods. Before delivering results with a diagnostic purpose, a validation assay with such extraction method should be done.

CAUTION!

All biological and blood samples should be treated as potentially infectious. When manipulating them, the corresponding basic (universal) precautions should be taken.

9- Usage procedures

→ PCR setup

PRECAUTIONS!

- Define pre- and post-PCR work areas that should be kept separated to reduce the risk of contamination. Prepare the PCR in the pre-PCR area. Use lab coat and disposable gloves.
- Work on ice or over a cool block. Minimize the time between preparation and start of the assay.
- For each assay, it is recommended to test the contamination control (Reaction Blank) and both Positive Control (C1 and C2) included in the kit.

→ Disposal

Waste products shall be managed according to local regulation.

10- Results

→ Results visualization

The analysis of the results is performed with the specific software of the qPCR instrument being used, and according to the manufacturer's instructions for use.

Once the run is finished, select the linear scale to visualize the amplification curves. It is recommended to check the correct behaviour of the obtained amplification curves:

- An amplification signal is considered positive if a quick and regular (exponential) increase of fluorescence values is observed (sigmoidal amplification) with Ct<35.
- A weak fluorescent, background signal or exponential signal with Ct>35 should not be considered a positive amplification. This assay allows the detection of alleles that differ by only one nucleotide and, therefore, in samples homozygous for one of the alleles, weak non-specific signals from the fluorophore used for the detection of the other allele can be observed. The appearance of these signals does not invalidate the assay.

A sample is considered positive if it produces an exponential amplification with a Ct value <35. A sample is considered negative if it produces a non-exponential amplification with low intensity or an exponential amplification with Ct value >35.

CAUTION

To determine the Ct value in each channel, adjust the threshold line as follows:

Select linear scale view and choose the region where the fluorescence signal is stable before exponential amplification. Place the threshold line above this background signal, so that it crosses close to the inflection point of the amplification curve. This line should slightly exceed the value of highest fluorescence obtained with negative samples for the allele detected in this channel.

→ Interpretation of results

Results of this kit can be interpreted by visualization of the amplification curves or by scatter plot of the end-point intensity values in the FAM/HEX (for H63D genotyping) or ROX/Cy5 (for C282Y genotyping) channels.

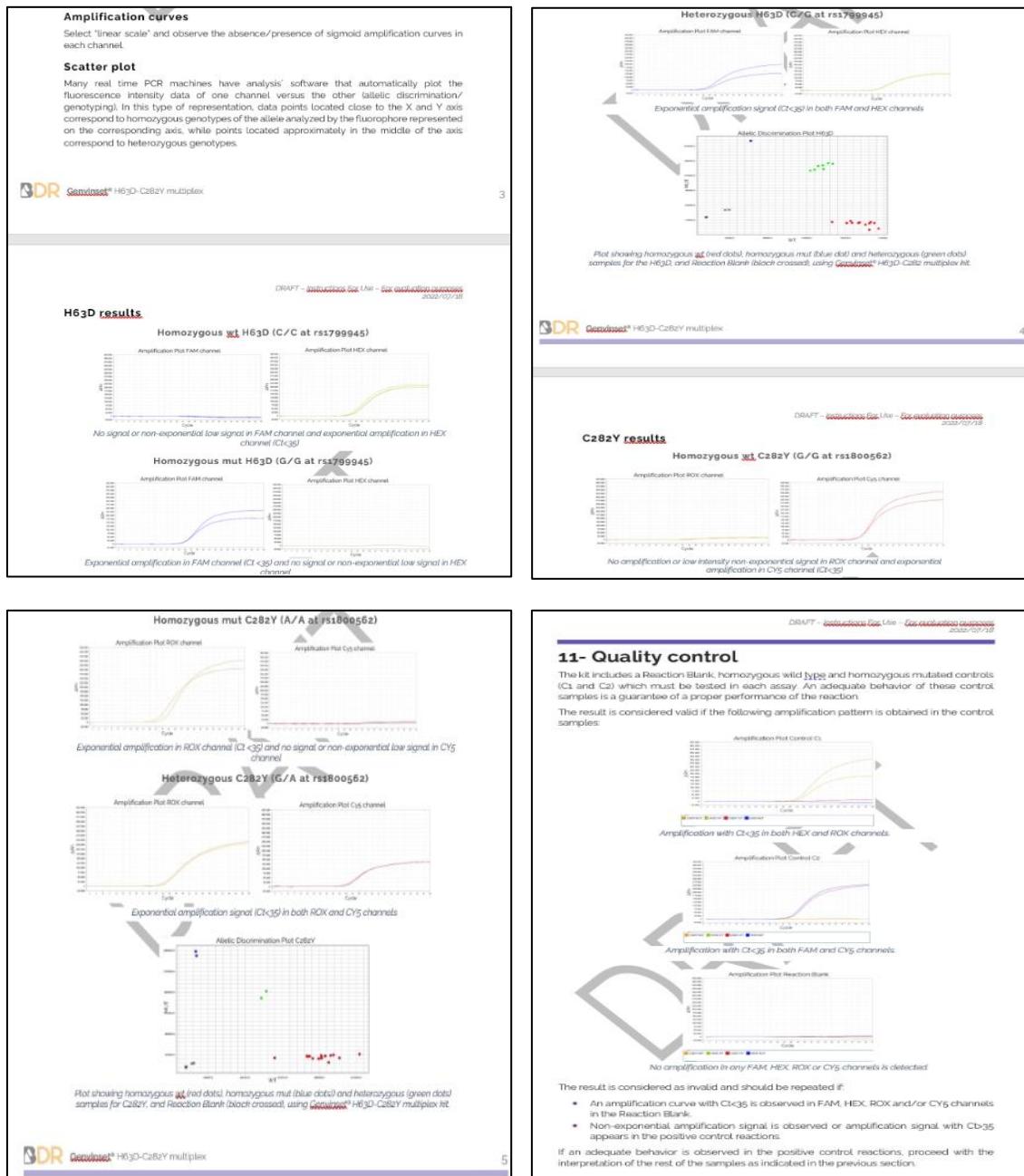


Figura 44. Distintas partes que componen el DRAFT de la IFU enviados a las empresas que realizan las validaciones externas del kit de multiplexación. Este DRAFT debe estar en inglés ya que se envía a distintas partes del mundo. El formato de texto y disposición de los datos viene establecido por el departamento de calidad.

En este DRAFT se dispone toda la información necesaria para que cualquier técnico de cualquier laboratorio pueda realizar de forma adecuada el ensayo de validación del kit.

7.7. Anexo 7. Etiquetas HFE H63D y C282Y

Atendiendo a la imágenes de la figura 26 donde se expone un modelo de etiqueta de los kits singleplex H63D y C282Y se pueden distinguir varios símbolos que dan información acerca del producto:

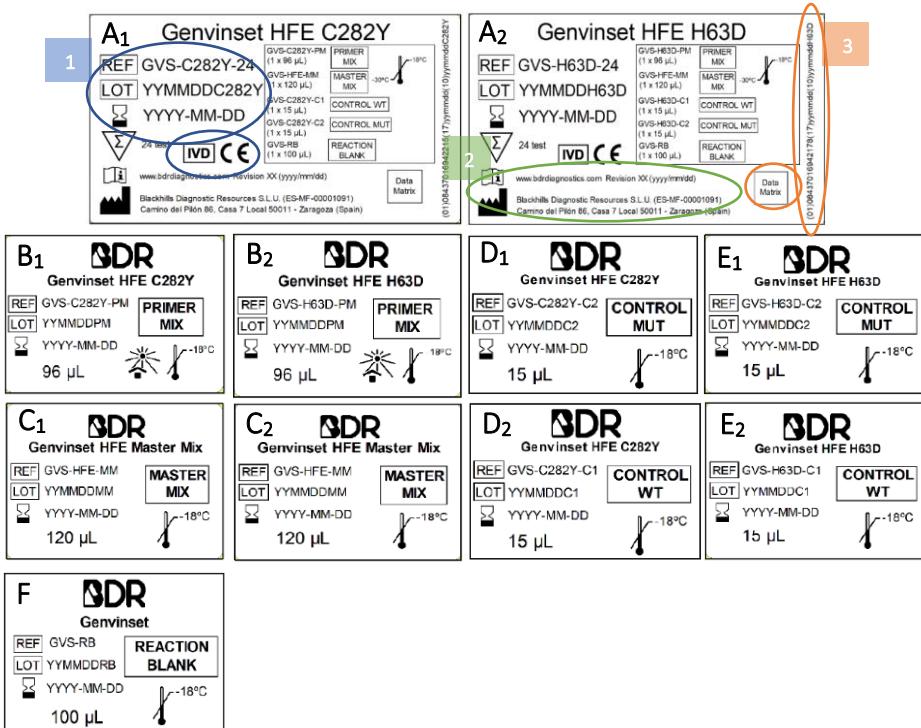


Figura 26. Etiquetas modelo de los kits singleplex H63D y C282Y. A. Etiqueta trasera de los kits C282Y (A₁) y H63D (A₂) que incluye información general del mismo y los componentes de la primer mix y master mix. B. Etiquetas de la primer mix del kit C282Y (B₁) y H63D (B₂). C. Etiquetas de la master mix del kit C282Y (C₁) y H63D (C₂). D, E. Etiquetas de los controles C282Y (D₁ y D₂) y H63D (D₃ y D₄) del kit. F. Etiqueta del blanco.

- 1
 - **Referencia (ref), lote (lot) y caducidad del kit.** Los lotes corresponden a un cierto número de productos que se almacenan y fabrican juntos en un solo paquete; mientras que la referencia son códigos alfanuméricos de identificación dados a un producto en particular, para permitir el seguimiento histórico de un ítem desde la recepción hasta la entrega y posterior a la entrega (128).
- 1
 - **Marcado CE e IVD.** Distintivos de que se trata de un dispositivo de IVD con marcado CE lo que lo certifica que cumple con la directiva europea de dispositivos de IVD (IVDD 97/79/EC) para ser comercializados legalmente en la UE. Ver apartado 3.1. Definición del producto a desarrollar.
- 2
 - **Datos del fabricante.** URL, localizador de recursos uniforme, y dirección de la empresa. También se incluye el número de revisión del producto en función de las modificaciones o mejoras que haya habido del mismo.
- 3
 - **Data matrix y GTIN.** El código comercial global de artículo (GTIN) es un identificador único y reconocido internacionalmente para un producto específico (129). Datamatrix, o codificación de datos 2D (2 dimensiones), es un sistema industrial de codificación bidimensional que permite la generación de un gran volumen de información en un formato muy reducido, con una alta fiabilidad de lectura gracias a sus sistemas de información redundante y corrección de errores (130).

7.8. Anexo 8. Datos e información obtenida en el ensayo de reproducibilidad y repetibilidad

Anexo 8.1. Ensayo de reproducibilidad

Las tablas a continuación muestran los datos de genotipo, C_t y concordancia obtenidos para todas las muestras analizadas en el ensayo de reproducibilidad.

Tabla 11. Tabla resumen de los datos analíticos a estudiar en el ensayo de reproducibilidad para la mutación H63D. La tabla incluye información sobre el genotipo de cada muestra, los valores C_t obtenidos en cada ensayo y si, finalmente, los resultados son concordantes.

Muestra	Genotipo	Lote	Alelo 1Ct	Alelo 2Ct	RESULTADO	CONCORDANCIA
Muestra 10	Homo Wt	1	22,30	-	De acuerdo	
		2	20,81	-	De acuerdo	100 %
		3	24,03	-	De acuerdo	
Muestra 11	Homo Wt	1	24,32	-	De acuerdo	
		2	21,96	-	De acuerdo	100 %
		3	24,87	-	De acuerdo	
Muestra 12	Hetero	1	25,08	24,02	De acuerdo	
		2	22,67	23,62	De acuerdo	100 %
		3	25,56	24,00	De acuerdo	
Muestra 13	Homo Mut	1	-	21,61	De acuerdo	
		2	-	21,58	De acuerdo	100 %
		3	-	21,73	De acuerdo	
Muestra 14	Hetero	1	23,79	22,65	De acuerdo	
		2	21,50	22,48	De acuerdo	100 %
		3	24,64	23,17	De acuerdo	
Muestra 15	Hetero	1	24,39	23,18	De acuerdo	
		2	21,93	22,99	De acuerdo	100 %
		3	24,94	23,21	De acuerdo	
Muestra 16	Homo Wt	1	25,11	-	De acuerdo	
		2	22,55	-	De acuerdo	100 %
		3	25,54	-	De acuerdo	
Muestra 17	Homo Wt	1	23,31	-	De acuerdo	
		2	18,98	-	De acuerdo	100 %
		3	21,56	-	De acuerdo	
Muestra 18	Homo Wt	1	23,68	-	De acuerdo	
		2	20,20	-	De acuerdo	100 %
		3	24,01	-	De acuerdo	
Muestra 19	Homo Wt	1	23,27	-	De acuerdo	
		2	20,39	-	De acuerdo	100 %
		3	23,31	-	De acuerdo	
Muestra 20	Homo Wt	1	24,71	-	De acuerdo	
		2	21,94	-	De acuerdo	100 %

		3	25,71	-	De acuerdo	
		1	24,63	23,40	De acuerdo	
Muestra 21	Hetero	2	22,17	23,37	De acuerdo	100 %
		3	25,69	23,92	De acuerdo	
		1	21,07	-	De acuerdo	
Muestra 22	Homo Wt	2	20,39	-	De acuerdo	100 %
		3	23,89	-	De acuerdo	
		1	19,44	-	De acuerdo	
Muestra 23	Homo Wt	2	18,78	-	De acuerdo	100 %
		3	21,98	-	De acuerdo	
		1	21,60	-	De acuerdo	
Muestra 24	Homo Wt	2	17,26	-	De acuerdo	100 %
		3	19,99	-	De acuerdo	
		1	24,03	23,04	De acuerdo	
Muestra 25	Hetero	2	21,19	22,35	De acuerdo	100 %
		3	23,05	21,85	De acuerdo	
		1	23,24	22,68	De acuerdo	
Muestra 26	Hetero	2	21,98	20,96	De acuerdo	100 %
		3	23,90	22,81	De acuerdo	
		1	25,65	24,73	De acuerdo	
Muestra 27	Hetero	2	23,16	24,14	De acuerdo	100 %
		3	26,58	24,97	De acuerdo	
		1	22,61	-	De acuerdo	
Muestra 28	Homo Wt	2	18,98	-	De acuerdo	100 %
		3	23,23	-	De acuerdo	

Tabla 12. Tabla resumen de los datos analíticos a estudiar en el ensayo de reproducibilidad para la mutación C282Y. La tabla incluye información sobre el genotipo de cada muestra, los valores Ct obtenidos en cada ensayo y si, finalmente, los resultados son concordantes.

	Genotipo	Lote	Alelo 1Ct	Alelo 2Ct	RESULTADO	CONCORDANCIA
		1	-	21,46	De acuerdo	100 %
Muestra 10	Homo Mut	2	-	22,08	De acuerdo	
		3	-	18,44	De acuerdo	
		1	-	23,48	De acuerdo	100 %
Muestra 11	Homo Mut	2	-	23,27	De acuerdo	
		3	-	16,88	De acuerdo	
		1	24,40	24,07	De acuerdo	100 %
Muestra 12	Hetero	2	23,69	24,24	De acuerdo	
		3	24,41	20,75	De acuerdo	
		1	22,22	-	De acuerdo	100 %
Muestra 13	Homo Wt	2	21,69	-	De acuerdo	
		3	22,19	-	De acuerdo	
		1	22,14	-	De acuerdo	100 %
Muestra 14	Homo Wt	2	21,21	-	De acuerdo	
		3	22,35	-	De acuerdo	

		1	23,83	23,49	De acuerdo	100 %
Muestra 15	Hetero	2	23,61	23,21	De acuerdo	
		3	23,57	19,90	De acuerdo	
		1	24,56	-	De acuerdo	100 %
Muestra 16	Homo Wt	2	23,72	-	De acuerdo	
		3	24,25	-	De acuerdo	
		1	23,04	-	De acuerdo	100 %
Muestra 17	Homo Wt	2	20,29	-	De acuerdo	
		3	20,77	-	De acuerdo	
		1	22,84	-	De acuerdo	100 %
Muestra 18	Homo Wt	2	21,47	-	De acuerdo	
		3	23,01	-	De acuerdo	
		1	22,58	-	De acuerdo	100 %
Muestra 19	Homo Wt	2	21,42	-	De acuerdo	
		3	22,16	-	De acuerdo	
		1	23,96	-	De acuerdo	100 %
Muestra 20	Homo Wt	2	23,10	-	De acuerdo	
		3	24,02	-	De acuerdo	
		1	22,87	-	De acuerdo	100 %
Muestra 21	Homo Wt	2	22,02	-	De acuerdo	
		3	23,32	-	De acuerdo	
		1	20,62	-	De acuerdo	100 %
Muestra 22	Homo Wt	2	21,63	-	De acuerdo	
		3	22,85	-	De acuerdo	
		1	19,22	-	De acuerdo	100 %
Muestra 23	Homo Wt	2	20,23	-	De acuerdo	
		3	21,15	-	De acuerdo	
		1	21,21	-	De acuerdo	100 %
Muestra 24	Homo Wt	2	18,6	-	De acuerdo	
		3	19,06	-	De acuerdo	
		1	22,66	-	De acuerdo	100 %
Muestra 25	Homo Wt	2	21,35	-	De acuerdo	
		3	21,20	-	De acuerdo	
		1	21,86	-	De acuerdo	100 %
Muestra 26	Homo Wt	2	20,83	-	De acuerdo	
		3	21,88	-	De acuerdo	
		1	23,86	-	De acuerdo	100 %
Muestra 27	Homo Wt	2	22,84	-	De acuerdo	
		3	24,20	-	De acuerdo	
		1	22,12	-	De acuerdo	100 %
Muestra 28	Homo Wt	2	21,25	-	De acuerdo	
		3	22,24	-	De acuerdo	

Las imágenes a continuación respaldan la reproducibilidad del producto ya que se obtienen los mismos resultados, para cada muestra, en distintos días y diferentes termocicladores.

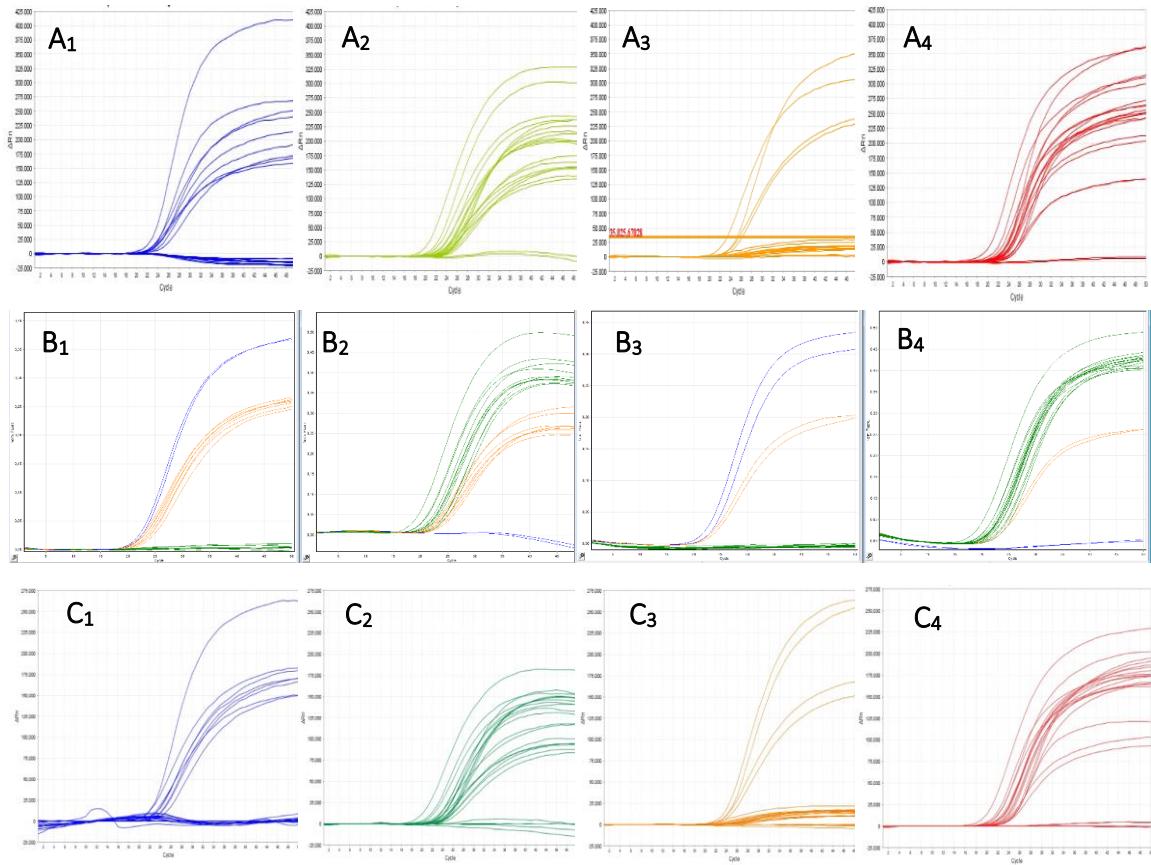


Figura 45. Curvas de amplificación de los canales donde se miden los 4 fluoróforos para las muestras estudiadas en el ensayo de reproducibilidad. A1-A4. Curvas de amplificación del termociclador ABI 7500. Eje Y. Medida de la fluorescencia como ΔRn . Eje X. Número de ciclos. B1-B4. Curvas de amplificación del termociclador RG. Eje Y. Medida de la fluorescencia como fluorescencia normalizada. Eje X. Número de ciclos. C1-C4. Curvas de amplificación del termociclador QS5Dx. Eje Y. Medida de la fluorescencia como ΔRn . Eje X. Número de ciclos. Las 4 imágenes que componen los resultados obtenidos por cada termociclador incluyen de Izda. a Dcha.: curvas de amplificación para los canales FAM, HEX, ROX y CY5.

Atendiendo a las imágenes de la figura siguiente se obtiene un 100 % de repetibilidad en las muestras ensayadas en el estudio.

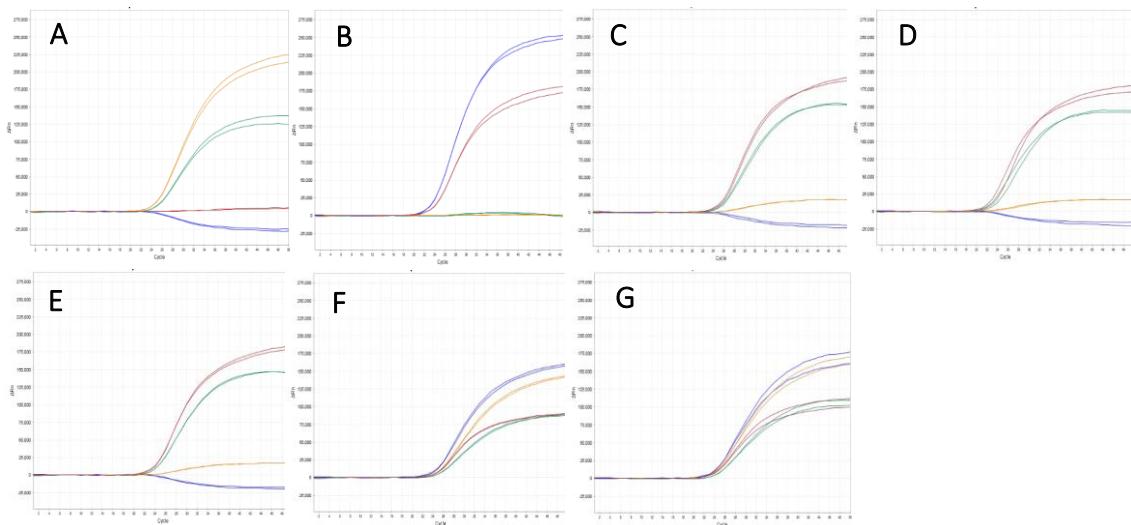


Figura 46. Curvas de amplificación de los canales donde se miden los 4 fluoróforos para las muestras estudiadas en el ensayo de repetibilidad en el termociclador QS5Dx. A. Duplicado de la muestra homocigota mutada para C282Y y homocigota wildtype para H63D. B. Duplicado de la muestra homocigota wildtype para C282Y y homocigota mutada para H63D. C-E. Duplicado de la muestra homocigota wildtype para H63D y C282Y. F, G. Duplicado de la muestra heterocigota para H63D y C282Y. La línea azul hace referencia al canal FAM, la línea verde al canal HEX, la línea naranja al canal ROX y la línea roja al canal Cy5. Eje Y. Medida de la fluorescencia como ΔRn . Eje X. Número de ciclos.

Las tablas a continuación muestran los datos del CV y SD para las intensidades finales y C_t de cada muestra.

Tabla 13. Tabla resumen de los datos analíticos a estudiar en el ensayo de repetibilidad para la mutación H63D. La tabla incluye información sobre el genotipo de cada muestra, los valores C_t e intensidades finales obtenidas en cada ensayo y las medidas de dispersión (CV y SD) de estos C_t e intensidades finales.

Muestra	Lote	Genotipo	Alelo 1 ΔRn HEX	Alelo 2 ΔRn FAM	Alelo 1/2	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)
Muestra 29	1	Homo Mut	1000,00	253666,89	0,00	0,00	0,00	0%
	2		1000,00	249119,59	0,00			
Muestra 30	1	Homo Mut	1000,00	272264,06	0,00	0,00	0,00	0%
	2		1000,00	273018,97	0,00			
Muestra 31	1	Homo Wt	124913,57	1000,00	124,91	131,02	6,26	5%
	2		137428,80	1000,00	137,43			
Muestra 32	1	Homo Wt	153072,53	1000,00	153,07	153,87	0,80	1%
	2		154671,70	1000,00	154,67			
Muestra 33	1	Homo Wt	152404,39	1000,00	152,40	153,19	0,79	1%
	2		153982,98	1000,00	153,98			
Muestra 34	1	Homo Wt	142345,97	1000,00	142,35	143,28	0,94	1%
	2		144229,28	1000,00	144,23			
Muestra 35	1	Hetero	87004,33	157611,91	0,55	0,55	0,01	1%
	2		87104,72	160705,20	0,54			
Muestra 36	1	Hetero	101495,09	180755,95	0,56	0,59	0,03	5%
	2		106198,14	171596,23	0,62			
Muestra 37	1	Hetero	109280,02	177448,02	0,62	0,63	0,01	2%
	2		102650,68	160773,92	0,64			
Muestra 38	1	Homo Wt	152964,33	1000,00	152,96	151,81	1,15	1%
	2		150670,27	1000,00	150,67			
Muestra 39	1	Homo Wt	145801,42	1000,00	145,80	145,83	0,03	0%
	2		145852,83	1000,00	145,85			

Muestra	Alelo 1			Alelo 2				
	Alelo 1 Ct HEX	Alelo 2 Ct FAM	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)
Muestra 29	0,00	22,68	0,00	0,00	0%	22,68	0,00	0%
	0,00	22,68						
Muestra 30	0,00	22,55	25,35	0,05	0%	0,00	0,00	0%
	0,00	22,62						
Muestra 31	25,40	0,00	26,15	0,08	0%	24,48	0,09	0%
	25,30	0,00						
Muestra 32	24,57	0,00	0,00	0,00	0%	22,68	0,00	0%
	24,56	0,00						
Muestra 33	25,51	0,00	0,00	0,00	0%	22,58	0,03	0%
	25,70	0,00						
Muestra 34	22,54	0,00	25,35	0,05	0%	0,00	0,00	0%
	23,55	0,00						
Muestra 35	26,23	24,57	24,57	0,01	0%	0,00	0,00	0%
	26,07	24,39						
Muestra 36	26,24	24,53	25,61	0,09	0%	0,00	0,00	0%

	26,04	24,36							
Muestra 37	25,35	23,92	23,04	0,51	2%	0,00	0,00	0%	
	25,27	23,87							
Muestra 38	24,26	0,00	24,29	0,03	0%	0	0	0%	
	24,32	0,00							
Muestra 39	24,13	0,00	24,14	0,01	0%	0	0	0%	
	24,15	0,00							

Tabla 14. Tabla resumen de los datos analíticos a estudiar en el ensayo de repetibilidad para la mutación C282Y. La tabla incluye información sobre el genotipo de cada muestra, los valores C_t e intensidades finales obtenidas en cada ensayo y las medidas de dispersión (CV y SD) de estos C_t e intensidades finales.

Muestra	Lote	Genotipo	Alelo 1 ΔRn Cy5	Alelo 2 ΔRn ROX	Alelo 1/2	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)
Muestra 29	1		183098,05	839,51	218,10			
	2	Homo Wt	173576,92	952,22	182,29	199,39	17,91	9%
Muestra 30	1		183842,33	950,63	193,39			
	2	Homo Wt	187235,11	1045,63	179,06	186,225	7,165	4%
Muestra 31	1		5347,97	214113,05	0,02			
	2	Homo Mut	3936,82	224652,19	0,02	0,02	0,00	0%
Muestra 32	1		4954,34	259080,64	0,02			
	2	Homo Mut	5299,95	255507,22	0,02	0,02	0,00	0%
Muestra 33	1		187637,20	17940,59	10,46			
	2	Homo Wt	191882,25	17708,44	10,84	10,65	0,19	2%
Muestra 34	1		172109,00	17078,87	10,08			
	2	Homo Wt	180761,13	17057,97	10,60	10,33	0,26	3%
Muestra 35	1		90158,28	142484,36	0,63			
	2	Hetero	90179,27	144397,00	0,62	0,63	0,00	0%
Muestra 36	1		105497,79	166134,92	0,64			
	2	Hetero	102575,92	169745,72	0,60	0,62	0,02	2%
Muestra 37	1		111897,25	170450,27	0,66			
	2	Hetero	99833,70	159994,89	0,62	0,64	0,02	3%
Muestra 38	1		191174,23	18052,05	10,59			
	2	Homo Wt	187551,31	18483,62	10,15	10,37	0,22	2%
Muestra 39	1		179053,67	16715,26	10,71			
	2	Homo Wt	184103,92	16595,79	11,09	10,90	0,19	2%

Muestra	Alelo 1			Alelo 2				
	Alelo 1 Ct Cy5	Alelo 2 Ct ROX	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)
Muestra 29	23,46	0,00	23,49	0,03	0%	0,00	0,00	0%
	23,52	0,00						
Muestra 30	23,54	0,00	23,51	0,03	0%	0,00	0,00	0%
	23,48	0,00						
Muestra 31	0,00	24,47	0,00	0,00	0%	24,45	0,02	0%
	0,00	24,42						
Muestra 32	0,00	23,62	0,00	0,00	0%	23,66	0,04	0%
	0,00	23,70						
Muestra 33	24,87	32,19	25,02	0,15		32,34	0,16	0%

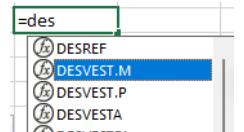
	25,16	32,50			1%			
Muestra 34	22,00	29,48	22,46	0,46	2%	29,88	0,39	1%
	22,93	30,27						
Muestra 35	25,50	25,29	25,46	0,04	0%	25,27	0,03	0%
	25,42	25,24						
Muestra 36	25,39	25,15	25,40	0,01	0%	25,12	0,03	0%
	25,41	25,10						
Muestra 37	24,52	24,27	24,57	0,05	0%	24,23	0,04	0%
	24,62	24,20						
Muestra 38	23,75	30,96	23,76	0,01	0%	30,97	0,01	0%
	23,78	30,98						
Muestra 39	23,55	31,27	23,59	0,04	0%	31,24	0,03	0%
	23,62	31,20						

Para determinar si el producto es repetible o no es necesario calcular las medidas de dispersión mostradas en la tabla para calcular el CV indicativo de la dispersión de los datos.

Para calcular la media de los datos basta con sumar los distintos resultados y dividirlos a continuación por el recuento de dichos resultados.

Para la muestra 29, la media del C_t del alelo 1 (Cy5): $X = \frac{23,46+23,52}{2} = 23,49$

Por otra parte, la SD se calcula como la raíz cuadrada de la varianza. Es decir, la raíz cuadrada de la media de los cuadrados de las desviaciones. Este dato se puede calcular directamente mediante la función excell:



El CV, medida que indica la dispersión, se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{\sigma_x}{|\bar{X}|}$$

Su cálculo se obtiene de dividir la SD entre el valor absoluto de la media del conjunto y por lo general se expresa en porcentaje para su mejor comprensión (125).

Para la muestra 29, el CV del C_t del alelo 1 (Cy5): $CV = \frac{0,03}{23,49} = 0,00 = 0\%$

Este valor indica la dispersión de los resultados obtenidos en cada lote es 0 %, es decir, no hay variación en los datos. Para esta medida, el producto es 100 % repetible.

7.9. Anexo 9. Ensayo de sensibilidad analítica

Anexo 9.1 Valores C_t y curvas estándar LoD

Las tablas siguientes dan información acerca de los valores C_t para cada triplicado de cada muestra del ensayo LoD. Con esta información se pueden realizar curvas patrón o estándar útil para determinar, en este caso, el C_t presente en una muestra incógnita (figura 47).

Tabla 15. Tabla resumen de los datos analíticos a estudiar para determinar el LoD. La tabla incluye información acerca del genotipo de la muestra, cantidad de DNA de entrada, valores C_t y parámetros analíticas de dispersión para la mutación H63D.

Homocigota wildtype H63D		Ct FAM			Ct FAM			Ct HEX			Ct HEX			
Muestra	ADN (ng)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	
Muestra 4 dil 0	0							24,51						
Muestra 4 dil 0	40	0	0	0%	24,54	24,58	0,08	0%						
Muestra 4 dil 0		0						24,69						
Muestra 4 dil 1	0							26,61						
Muestra 4 dil 1	13,3	0	0	0%	26,38	26,38	0,19	1%						
Muestra 4 dil 1		0						26,15						
Muestra 4 dil 2	0							27,73						
Muestra 4 dil 2	4,44	0	0	0%	27,78	27,82	0,10	0%						
Muestra 4 dil 2		0						27,96						
Muestra 4 dil 3	0							30,06						
Muestra 4 dil 3	1,48	0	0	0%	29,83	29,88	0,13	0%						
Muestra 4 dil 3		0						29,75						
Muestra 4 dil 4	0							31,92						
Muestra 4 dil 4	0,49	0	0	0%	31,68	31,78	0,11	0%						
Muestra 4 dil 4		0						31,74						
Homocigoto mutado H63D		Ct FAM			Ct FAM			Ct HEX			Ct HEX			
Muestra	ADN (ng)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	
Muestra2dil0	40	23,029	23,06	0,12	1%	0	0	0	0	0%				
Muestra2dil0		23,223				0								
Muestra2dil0		22,930				0								
Muestra2dil1	13,3	24,686	24,79	0,08	0%	0	0	0	0	0%				
Muestra2dil1		24,890				0								
Muestra2dil1		24,793				0								
Muestra2dil2	4,44	25,981	26,24	0,23	1%	0	0	0	0	0%				
Muestra2dil2		26,191				0								
Muestra2dil2		26,536				0								
Muestra2dil3	1,48	28,039	28,01	0,09	0%	0	0	0	0	0%				
Muestra2dil3		27,893				0								
Muestra2dil3		28,107				0								
Muestra2dil4	0,49	30,401	30,10	0,40	1%	0	0	0	0	0%				
Muestra2dil4		30,377				0								
Muestra2dil4		29,536				0								

Tabla 16. Tabla resumen de los datos analíticos a estudiar para determinar el LoD. La tabla incluye información acerca del genotipo de la muestra, cantidad de DNA de entrada, valores C_t y parámetros analíticas de dispersión para la mutación C282Y.

Homocigota mutada C282Y		Ct ROX			Ct ROX			Ct Cy5			Ct Cy5			
Muestra	ADN (ng)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	
Muestra4dil 0	40	22,95	23,01	0,05	0%	0	0	0	0	0%				

Muestra4dil 0	23,01				0				
Muestra4dil 0	23,08				0				
Muestra4dil 1	24,89				0				
Muestra4dil 1	13,3	24,88	24,75	0,19	1%	0	0	0	0%
Muestra4dil 1	24,47				0				
Muestra4dil 2	26,06				0				
Muestra4dil 2	4,44	26,11	26,20	0,16	1%	0	0	0	0%
Muestra4dil 2	26,41				0				
Muestra4dil 3	28,18				0				
Muestra4dil 3	1,48	27,96	28,06	0,09	0%	0	0	0	0%
Muestra4dil 3	28,02				0				
Muestra4dil 4	29,96				0				
Muestra4dil 4	0,49	29,90	29,85	0,12	0%	0	0	0	0%
Muestra4dil 4	29,68				0				

Homocigota wildtype C282Y		Ct ROX		Ct ROX		Ct Cy5		Ct Cy5	
Muestra	ADN (ng)	Media	Desviaci ón típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)
Muestra2dil0	0				25,69	25,76	0,09	0%	
Muestra2dil0	40	0	0	0%	25,89				
Muestra2dil0	0				25,70				
Muestra2dil1	0				27,38	27,48	0,10	0%	
Muestra2dil1	13,3	0	0	0%	27,62				
Muestra2dil1	0				27,44				
Muestra2dil2	0				28,88	28,95	0,12	0%	
Muestra2dil2	4,44	0	0	0%	28,84				
Muestra2dil2	0				29,12				
Muestra2dil3	0				30,86	30,78	0,06	0%	
Muestra2dil3	1,48	0	0	0%	30,74				
Muestra2dil3	0				30,75				
Muestra2dil4	0				33,36	33,19	0,22	1%	
Muestra2dil4	0				33,34				
Muestra2dil4	0,49	0	0	0%	32,88				

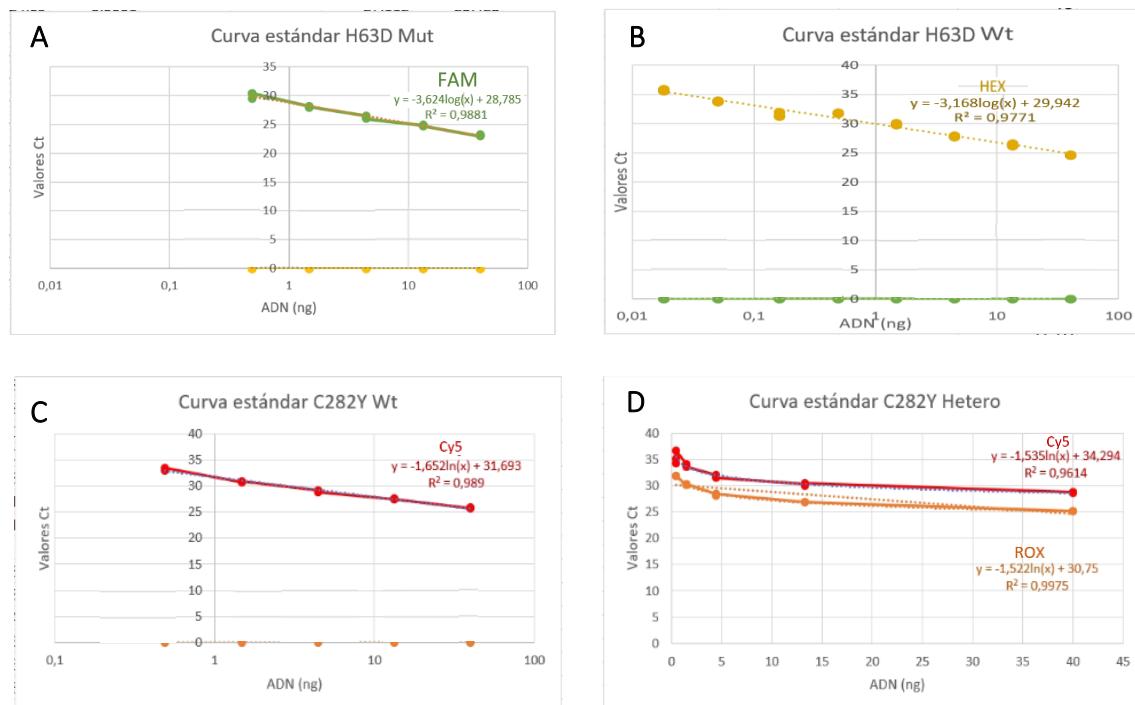
Heterocigota C282Y		Ct ROX		Ct ROX		Ct Cy5		Ct Cy5	
Muestra	ADN (ng)	Media	Desviaci ón típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)	Coeficiente de variación (CV)	Media	Desviación típica (SD)
Muestra7dil0	25,14				28,59				
Muestra7dil0	40	25,17	25,15	0,02	0%	28,85	28,72	0,11	0%
Muestra7dil0	25,13				28,72				
Muestra7dil1	26,85				30,41				
Muestra7dil1	13,3	26,95	26,89	0,05	0%	30,05	30,29	0,17	1%
Muestra7dil1	26,86				30,40				
Muestra7dil2	28,43				31,58				
Muestra7dil2	4,44	28,13	28,31	0,13	0%	31,75	31,78	0,17	1%
Muestra7dil2	28,39				32,00				

Muestra7dil3	30,37					33,66			
Muestra7dil3	1,48	30,19	30,22	0,11	0%	33,98	33,91	0,18	1%
Muestra7dil3		30,10				34,09			
Muestra7dil4		31,85				36,63			
Muestra7dil4	0,49	31,82	31,85	0,03	0%	35,12	35,34	0,96	3%
Muestra7dil4		31,88				34,30			

La curva estándar proporciona información estadística como el valor R^2 . El R^2 es una herramienta estadística (un estadístico) que se utiliza en modelos estadísticos como en una regresión para predecir futuros resultados. El R^2 es el indicador que permite conocer cómo de bien se pueden predecir esos resultados. Por lo general, mientras mayor sea el R^2 , mejor será el ajuste del modelo a sus datos. El R^2 siempre se encuentra entre 0 y 1.

Analizando los valores R^2 de las imágenes siguientes se observa que los resultados concuerdan con los genotipos de las muestras ensayadas. Se obtienen valores $R^2 \sim 1$ en aquellos canales que las muestran deben dar señal y por tanto valores C_t distintos a 0. En el caso de los canales en los que la muestra no debe amplificar y, por tanto, los fluoróforos no dan señal no se calcula la línea de tendencia ya que, en estos casos, los valores C_t son 0.

- Las muestras mutadas H63D y C282Y dan valores $R^2 \sim 1$ en los canales FAM y ROX que miden estas muestras.
- La muestra heterocigota C282Y da valores $R^2 \sim 1$ en ambos canales ya que esta muestra da señal en todos los canales.
- Las muestras homocigotas wildtype H63D y C282Y únicamente dan valores $R^2 \sim 1$ en los canales HEX y Cy5.



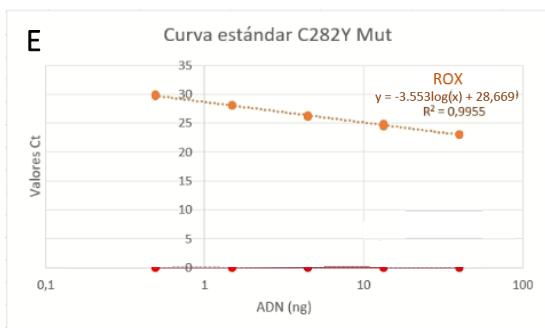


Figura 47. Curva patrón o estándar para la muestras analizadas en el ensayo de LoD. A. Curva patrón para la muestra homocigota mutada H63D. B. Curva patrón para la muestra heterocigota H63D. C. Curva patrón para la muestra homocigota wildtype C282Y. D. Curva patrón para la muestra para la muestra heterocigota C282Y. E. Curva patrón para la muestra homocigota mutada C282Y. Eje Y. Valores Ct. Eje X. Cantidad de ADN de entrada (ng).

Otro parámetro para evaluar es la eficiencia de la reacción. La eficiencia de una reacción de PCR también puede afectar al C_t . Una serie de diluciones amplificadas en condiciones de baja eficiencia podría producir una curva de patrones con una pendiente diferente de una amplificada en condiciones de alta eficiencia. La eficiencia de la PCR depende del ensayo, del rendimiento de la mezcla de reacción y de la calidad de las muestras. Por lo general, una eficiencia entre el 80 y el 120 % se considera aceptable. El resto podría resultar útil para concluir que hay menos cantidad de DNA en la primera muestra, suponiendo que todos los demás factores, como instrumentos, reactivos y ensayos sean iguales (131).

Idealmente, el número de moléculas de la secuencia diana debería duplicarse durante cada ciclo de replicación, lo que corresponde a una eficiencia de amplificación del 100 %. Del mismo modo, si el número de moléculas replicadas es inferior al doble, esto se debe a una baja eficiencia, se obtienen valores por debajo del 100 %. Las razones más comunes de eficiencias más bajas son un mal diseño del cebador y concentraciones de reactivos o condiciones de reacción no óptimas. Estructuras secundarias como dímeros y horquillas o T_m inapropiadas pueden dar como resultado una amplificación deficiente. El máximo teórico del 100 % indica que la enzima polimerasa está trabajando a su máxima capacidad. Sin embargo, en algunos casos la eficiencia de amplificación supera el 100 %. La razón principal de esto es la **inhibición de la polimerasa**. Incluso si se agrega más muestra a la mezcla de reactivos es posible que los valores de C_t no cambien a ciclos anteriores. Esto aplana el gráfico de eficiencia, lo que da como resultado una pendiente más baja y una eficiencia de amplificación de más del 100 %. Los inhibidores de la enzima polimerasa incluyen cantidades excesivas de ADN/ARN o material de arrastre en la muestra. Los contaminantes comunes incluyen heparina, hemoglobina, polisacáridos, clorofillas, proteinasa K (132)... Por lo tanto, valores superiores al 100 % se relaciona con la presencia de interferentes mencionada en el apartado 3.4.3.5. *Análisis alternativos: estudios de interferencias y cross-reactividad, 1. Estudio de interferentes.*

Al igual que ocurre para los valores R^2 , los resultados concuerdan con los genotipos de las muestras analizadas ya que se obtienen valores de eficiencia entre 80-120 % en aquellos canales en los que las muestras deben dar señal. Igual que antes, únicamente se dan valores de eficiencia en los canales en los que los fluoróforos dan señal.

- Las muestras mutadas H63D y C282Y dan valores Ef~80-120 % en los canales FAM y ROX que miden estas muestras.

Muestra homocigota mutada H63D canal FAM: Ef= 10^(-1/-3,624) -1= 0,89=89 %

Muestra homocigota mutada C282Y canal ROX: Ef= 10^(-1/-3,553) -1= 0,89=91 %

- La muestra heterocigota C282Y da valores Ef~80-120 % en ambos canales ya que esta muestra da señal en todos los canales.

Muestra heterocigota C282Y canal ROX: Ef= 10^(-1/-3,504) -1= 0,93=93 %

Muestra heterocigota C282Y canal Cy5: Ef= 10^(-1/-3,534) -1= 0,92=92 %

- Las muestras homocigotas wildtype H63D y C282Y únicamente dan valores Ef~80-120 % en los canales HEX y Cy5, respectivamente.

Muestra homocigota wildtype H63D canal HEX: Ef= 10^(-1/-3,1684) -1= 1,07=107 %

Muestra homocigota wildtype C282Y canal Cy5: Ef= 10^(-1/-3,804) -1= 0,83=83 %

Anexo 9.2. Valores Ct Upper limit

Las tablas siguientes dan información acerca de los valores Ct de las diferentes diluciones de las muestras ensayadas.

Tabla 17. Tabla resumen de los datos analíticos a estudiar para determinar el Upper limit. La tabla incluye información acerca del genotipo de la muestra y valores Ct.

Muestra heterocigota H63D y C282Y (ng)	Ct HEX	Ct FAM	Ct Cy5	Ct ROX
800	20,99	20,00	20,66	20,16
400	22,79	21,65	22,35	21,84
200	23,70	22,02	23,02	22,67
100	24,76	23,05	24,02	23,69
50	25,73	23,96	24,97	24,55
25	26,83	24,97	25,95	25,51
12,5	28,14	26,21	27,48	26,87
6,25	29,07	27,07	28,23	27,77

Muestra homocigota mutada C282Y y homocigota wildtype H63D (ng)	Ct HEX	Ct FAM	Ct Cy5	Ct ROX
800	20,20	0,00	0,00	19,55
400	22,16	0,00	0,00	21,36
200	22,97	0,00	0,00	22,09
100	24,17	0,00	0,00	23,31
50	24,96	0,00	0,00	23,98
25	26,07	0,00	0,00	24,98
12,5	27,23	0,00	0,00	26,02
6,25	28,22	0,00	0,00	27,05

7.10. Anexo 10. Datos control de partida a tiempo 0 para ensayos de estabilidad e IN USE

Las tablas a continuación muestran los datos de genotipo, Ct e intensidades finales obtenidos para todas las muestras analizadas a tiempo 0.

Tabla 18. Tabla resumen de los datos analíticos a estudiar a tiempo para los ensayos de estabilidad e IN USE. La tabla incluye información sobre el genotipo de cada muestra, los valores C_t e intensidades finales obtenidos en cada ensayo.

ID Muestra	H63D	C282Y
Muestra 1	Homo Mut	Homo Wt
Muestra 2	Homo Mut	Homo Wt
Muestra 3	Homo Wt	Homo Mut
Muestra 4	Homo Wt	Homo Mut
Muestra 5	Homo Wt	Homo Mut
Muestra 6	Hetero	Hetero
Muestra 7	Hetero	Hetero
Muestra 8	Hetero	Hetero
Muestra 9	Homo Wt	homo Wt
C1 H63D MUT	Homo Mut	homo Wt
C2 C282Y MUT	Homo Wt	Homo Mut

Ct HEX	Ct FAM	Int f HEX	Int f FAM	Ct Cy5	Ct ROX	Int f Cy5	Int f ROX
-	22,63	-2.499,19	262.588,78	23,56	-	188.048,98	-743,43
-	21,73	-2.740,26	260.670,52	22,19	-	186.944,344	-1.567,24
25,33	-	142.452,09	-35.018,36	-	24,29	1.442,07	261.315,09
24,76	-	146.679,41	-33.623,36	-	23,85	3.905,08	268.311,56
24,14	-	138.218,45	-33.499,09	-	23,23	3.521,69	248.168,28
26,01	24,45	99.014,56	173.248,22	25,41	24,90	172.277,42	102.769,38
26,62	24,80	84.586,92	156.387,67	25,86	25,40	149.895,05	90.639,09
26,31	24,89	95.807,85	167.856,20	25,79	25,26	166.194,80	100.286,42
24,73	-	127.072,16	-17.155,71	24,02	32,85	167.900,80	684,28
-	25,23	-1.932,71	240.634,56	26,28	-	163.506,34	745,55
28,38	-	125.311,09	-28.413,98	-	27,35	1.154,65	211.225,53

7.11. Anexo 11. Pruebas de estabilidad

Anexo 11.1. Ct e intensidades finales

Las tablas a continuación muestran los datos de genotipo, C_t e intensidades finales obtenidos para todas las muestras analizadas a tiempo 1 (IN USE) tras 2 procesos de congelación/descongelación y a tiempo 2 (IN USE) tras 7 procesos de congelación/descongelación.

Tabla 19. Cuadro resumen de la información obtenida para cada muestra ensayada en el termociclador QS5Dx. El cuadro contiene información acerca de los valores de C_t e intensidades finales de las muestras analizadas.

ID Muestra	H63D	C282Y
Muestra 1	Homo Mut	Homo Wt
Muestra 2	Homo Mut	Homo Wt
Muestra 3	Homo Wt	Homo Mut
Muestra 4	Homo Wt	Homo Mut

Muestra 5	Homo Wt	Homo Mut
Muestra 6	Hetero	Hetero
Muestra 7	Hetero	Hetero
Muestra 8	Hetero	Hetero
Muestra 9	Homo Wt	homo Wt
C1 H63D MUT	Homo Mut	homo Wt
C2 C282Y MUT	Homo Wt	Homo Mut

Tiempo 1 (IN USE) tras 2 procesos de congelación/descongelación

Ct HEX	Ct FAM	Int f HEX	Int f FAM	Ct Cy5	Ct ROX	Int f Cy5	Int f ROX
-	22,76	-3889,75	219179,34	22,78	-	178071,03	-783,68
-	22,57	-2911,76	236176,64	22,78	-	180675,44	128,33
24,31	-	135143,13	1554,18	-	24,37	1825,34	233486,66
23,63	-	133612,05	2281,74	-	23,68	142,97	233269,78
22,69	-	145372,09	3592,67	-	22,76	2128,81	254287,78
26,69	26,37	92671,30	164743,88	26,43	26,78	97588,49	157558,66
25,11	24,91	89259,00	155001,38	25,11	25,23	89609,45	161336,86
24,83	24,69	100395,80	164632,39	24,84	24,98	104324,37	176665,73
23,74	-	138029,89	696,34	23,56	31,40	176623,75	15520,63
35,50	26,73	2073,95	245468,33	26,91	-	182291,78	906,74
27,17	-	143192,31	-671,96	-	27,09	2452,61	231770,05

Tiempo 2 (IN USE) tras 7 procesos de congelación/descongelación

Ct HEX	Ct FAM	Int f HEX	Int f FAM	Ct Cy5	Ct ROX	Int f Cy5	Int f ROX
-	23,63	-2111,99	239576,25	24,29	-	191422,39	-1449,80
-	22,41	-2420,08	229488,44	23,17	-	185029,16	-1060,05
30,81	-	115942,26	-26800,88	-	29,55	2229,53	204318,66
28,21	-	130803,60	-28122,94	-	27,09	1330,29	231145,41
22,89	-	139876,41	-31445,83	-	22,03	2303,68	243603,33
25,03	23,52	101238,15	155761,27	24,01	24,48	172606,41	99075,05
35,80	26,48	90903,52	213039,88	35,80	40,88	128067,06	16891,84
23,72	22,68	112513,77	152330,25	22,91	23,32	183003,95	105016,59
26,77	-	168320,86	-7473,57	27,44	-	168320,86	-1052,72
-	28,26	-25530,49	123900,25	27,07	-	215401,86	-358,53
35,96	-	76406,27	-13664,92	-	37,14	8601,85	61460,88

Anexo 11.2. Gráficas de estabilidad

Las curvas de estabilidad siguientes muestran la evolución del producto y analizan el efecto que tiene el proceso de congelación/descongelación para la muestra 1 (homocigota mutada para H63D y homocigota wildtype C282Y). Se muestran la curva de estabilidad del canal en el que amplifica la muestra para la mutación C282Y.

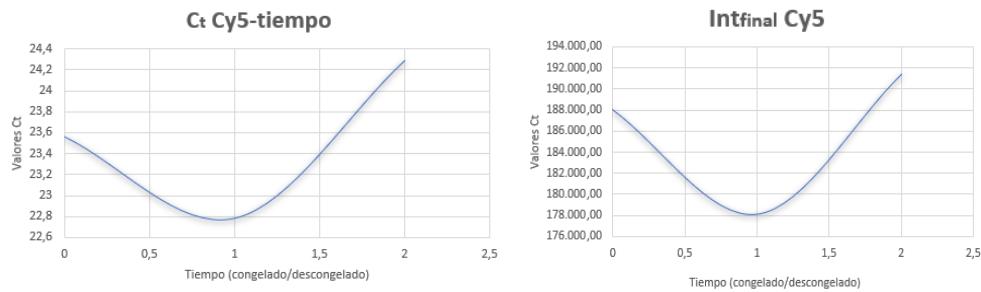
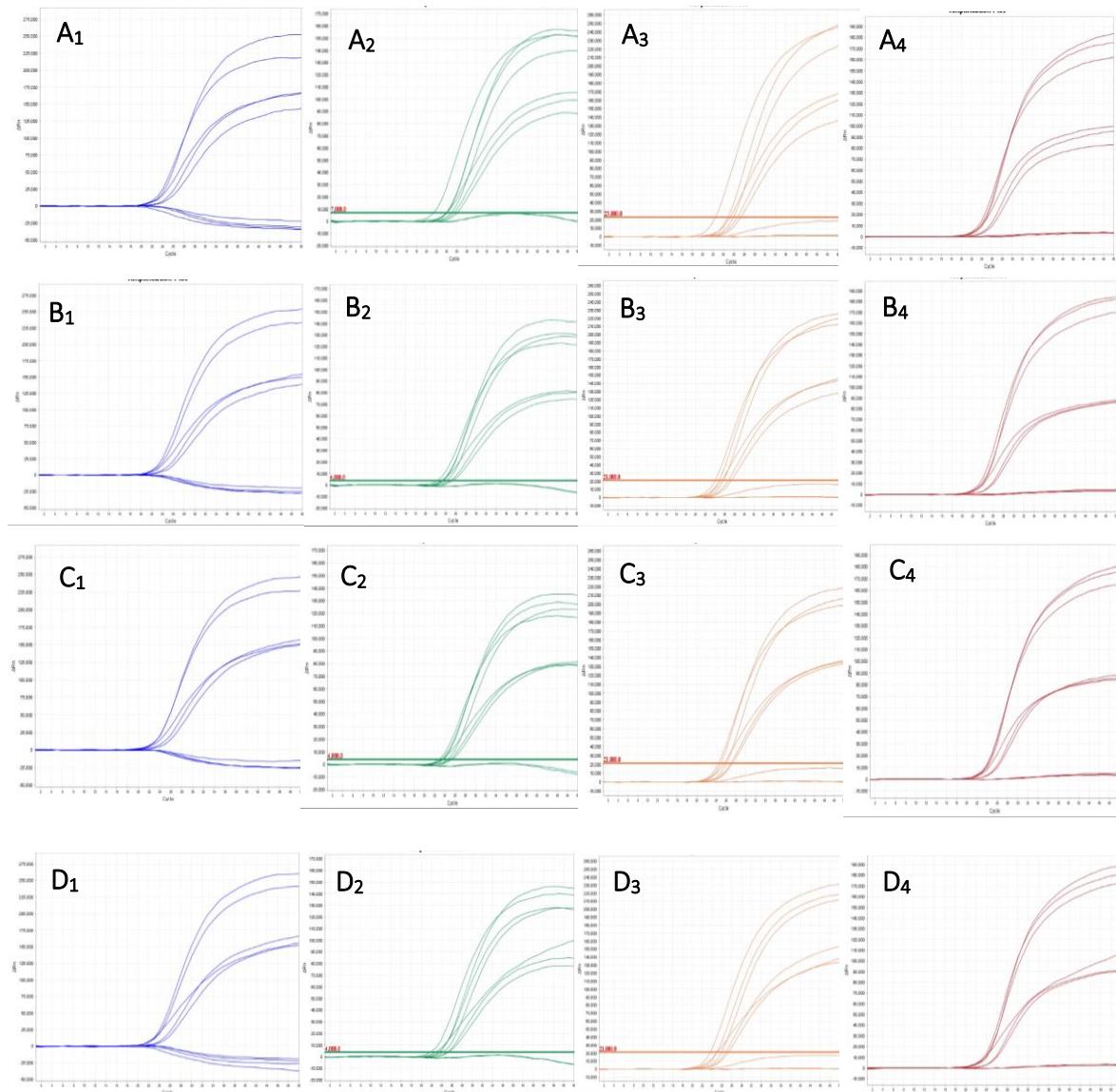


Figura 48. Gráfica de estabilidad en la que se observa el efecto que tienen los procesos de congelación/descongelación del kit de multiplexación. Se dan valores de C_t (izda) e intensidades finales (dcha) del canal rojo, Cy5, que mide las muestras wildtype C282Y para la muestra 1 (homocigota mutada H63D y homocigota wildtype C282Y). Eje Y. Distintos valores C_t . Eje X. Tiempo IN USE en descongelados/congelados.

7.12. Anexo 12. Pruebas de lotes, C_t e intensidades finales

Las figuras y tablas a continuación muestran los datos de genotipo, C_t e intensidades finales obtenidos para todas las muestras analizadas con 5 lotes distintos.



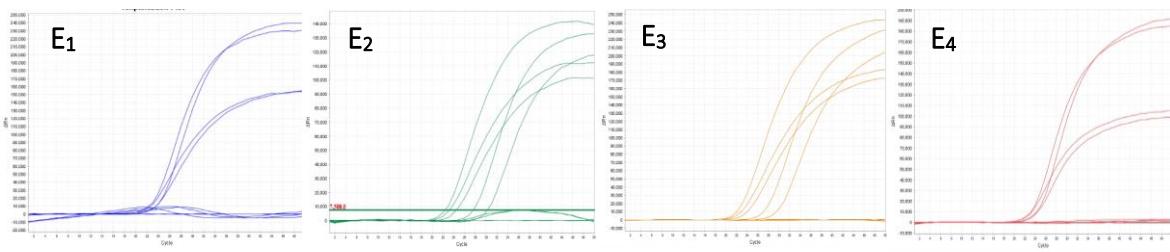


Figura 49. Curvas de amplificación de los canales donde se miden los 4 fluoróforos para las muestras estudiadas en el ensayo de prueba de lotes en el termociclador QS5Dx. A₁₋₄. Curvas de amplificación para muestras ensayadas con el lote 1. B₁₋₄. Curvas de amplificación para muestras ensayadas con el lote 2. C₁₋₄. Curvas de amplificación para muestras ensayadas con el lote 3. D₁₋₄. Curvas de amplificación para muestras ensayadas con el lote 4. E₁₋₄. Curvas de amplificación para muestras ensayadas con el lote 5. La línea azul hace referencia al canal FAM, la línea verde al canal HEX, la línea naranja al canal ROX y la línea roja al canal Cy5. Cada lote está fabricado en fecha distinta y varían en los lotes de la enzima, cebadores y sondas para la mutación H63D y cebadores y sondas para la mutación H63D. Tomando como referencia el lote 1, en el lote 2 se ha cambiado el lote de la enzima de la mezcla de reacción, en el lote 3 los cebadores y sondas de la mutación C282Y, en el lote 4 los cebadores de la mutación H63D y en el lote las sondas de la mutación H63D. Eje Y. Medida de la fluorescencia como ΔRn . Eje X. Número de ciclos.

Tabla 20. Tabla resumen de los datos analíticos a estudiar a tiempo para los ensayos de estabilidad e IN USE. La tabla incluye información sobre el genotipo de cada muestra, los valores C_t e intensidades finales obtenidos en cada ensayo.

ID Muestra	H63D	C282Y
Muestra 1	Homo Mut	Homo Wt
Muestra 2	Homo Mut	Homo Wt
Muestra 3	Homo Wt	Homo Mut
Muestra 4	Homo Wt	Homo Mut
Muestra 5	Homo Wt	Homo Mut
Muestra 6	Hetero	Hetero
Muestra 7	Hetero	Hetero
Muestra 8	Hetero	Hetero
Muestra 9	Homo Wt	Homo Wt
C1 H63D MUT	Homo Mut	Homo Wt
C2 C282Y MUT	Homo Wt	Homo Mut

Lote 1 (lote referencia)

Ct HEX	Ct FAM	Int f HEX	Int f FAM	Ct Cy5	Ct ROX	Int f Cy5	Int f ROX
28,61	22,92	1.128,87	252.138,26	28,61	-	184.154,84	955,45
28,87	22,44	478,98	218.949,70	28,82	-	182.333,12	435,79
23,95	-	138.934,34	2.053,04	23,99	22,39	3.592,35	220.022,78
22,85	-	151.684,19	2.417,15	22,82	21,57	3.622,95	226.013,21
20,28	-	152.139,59	4.131,26	20,25	18,92	4.259,76	213.480,56
24,99	25,13	89.001,80	142.968,98	24,93	23,60	82.875,31	141.348,38
22,87	23,09	105.297,56	165.538,03	22,88	21,34	87.858,83	143.932,66
24,31	24,45	99.672,91	167.054,77	24,34	23,05	86.194,21	146.220,34
23,01	-	156.540,16	1.225,84	23,09	25,70	184.554,31	15.699,36
-	27,80	-1.932,71	240.634,66	26,28	-	163.506,34	745,55
28,42	-	125.389,01	-28.785,98	-	28,59	1.154,58	212.975,03

Lote 2 (cambio del lote de la enzima)

Ct HEX	Ct FAM	Int f HEX	Int f FAM	Ct Cy5	Ct ROX	Int f Cy5	Int f ROX
-	22,50	-4.612,75	238.429,03	22,50	-	170.931,21	148,22
-	22,50	-4.850,76	254.073,84	22,53	-	165.157,39	306,60
23,93	-	128.382,31	1.661,29	23,93	22,27	4.113,28	206.456,84
22,99	-	130.319,05	2.379,71	22,93	21,58	5.082,20	218.252,33
22,06	-	121.699,23	3.524,11	22,02	20,65	3.664,50	198.562,38
23,06	23,12	81.451,50	150.996,13	23,02	21,50	84.753,92	135.621,81
24,55	24,46	80.735,79	154.443,25	24,57	22,89	85.407,19	136.846,47
25,09	25,16	74.460,63	139.014,53	25,00	23,65	85.795,08	128.816,55
23,17	-	141.785,13	1.018,34	23,18	25,51	180.523,47	15.534,23
-	24,67	1.045,75	256.935,96	24,67	-	156.986,37	453,59
25,38	-	57.957,75	-7.875,58	-	26,94	-7.948,45	75.834,35

Lote 3 (cambio del lote de los cebadores y sondas de la mutación C282Y)

Ct HEX	Ct FAM	Int f HEX	Int f FAM	Ct Cy5	Ct ROX	Int f Cy5	Int f ROX
-	22,56	-3.978,49	249.951,54	23,56	-	175.983,57	231,26
-	22,83	-5.605,80	226.638,37	23,85	-	181.199,62	1.130,13
24,23	-	123.186,65	2.279,33	24,26	22,82	3.676,45	212.127,41
23,05	-	126.880,75	1.943,06	23,06	21,64	3.306,14	218.426,31
22,59	-	116.633,53	2.833,74	22,57	21,30	2.987,03	231.159,84
23,36	23,06	79.693,09	154.264,09	23,32	21,64	107.755,83	138.568,56
24,61	24,46	82.069,38	158.041,13	24,69	23,29	92.292,85	153.392,16
25,02	25,25	79.140,88	149.755,47	25,08	23,36	88.242,94	133.472,22
23,30	-	135.058,75	3.071,35	23,35	25,86	188.882,81	17.216,93
-	25,23	-1.932,10	240.634,56	26,25	-	163.506,47	745,59
24,72	-	56748,78	-5749,40	-	36,79	-6758,55	86765,25

Lote 4 (cambio del lote de los cebadores de la mutación H63D)

Ct HEX	Ct FAM	Int f HEX	Int f FAM	Ct Cy5	Ct ROX	Int f Cy5	Int f ROX
-	22,94	-5.293,74	241.257,37	22,94	-	173.043,21	509,80
-	22,64	-4.862,71	260.575,01	22,64	-	-622,77	-707,05
23,97	-	128.209,82	489,56	23,97	22,37	-8.056,76	14.503,36
23,16	-	126.737,11	2.729,39	23,16	21,67	-5.664,30	10.758,19
21,70	-	138.090,03	1.261,85	21,70	20,43	-2.209,39	16.052,51
22,48	22,51	99.997,50	157.930,56	22,48	20,79	-857,89	8.101,98
24,71	24,54	85.433,41	165.963,38	24,71	23,06	-415,34	11.390,89
24,99	25,09	78.547,22	152.602,91	24,99	23,39	90.299,58	133.415,41
23,27	-	144.812,69	738,94	23,27	25,33	151.304,26	16.419,26
35,50	26,75	2.073,97	245.468,34	26,91	-	182.291,73	906,74
25,95	-	76.406,75	-13.664,22	-	37,14	8.601,85	61.460,87

Lote 5 (cambio del lote de las sondas de la mutación H63D)

Ct HEX	Ct FAM	Int f HEX	Int f FAM	Ct Cy5	Ct ROX	Int f Cy5	Int f ROX
30,92	23,50	-945,88	239.347,81	23,50	23,96	191.379,14	-572,87
29,63	22,21	-355,31	230.049,20	22,21	22,87	184.979,19	18,18
29,57	-	117.690,25	-2.581,09	-	29,44	3.651,16	204.481,89
26,96	-	132.959,72	409,27	-	26,98	2.688,17	231.363,70
21,70	-	139.507,41	4.367,70	-	21,94	2.779,11	244.281,56
23,74	23,37	101.457,78	155.415,90	23,95	24,07	172.411,11	99.452,41
22,42	22,43	112.265,33	153.714,00	22,88	22,97	182.661,43	104.681,28
25,87	24,53	89.059,88	145.867,90	25,87	21,45	76.679,75	143.756,64
25,34	-	146.978,57	456,78	23,54	27,65	165.645,68	14.576,46
-	28,26	-25.530,93	123.900,65	27,01	-	215.401,85	-358,57
27,13	-	143.192,34	-671,96	-	27,09	2.452,61	231.770,50