



Instrucciones de uso

Imegen® Inv16

Ref. IMG-109



Fabricado por:

HEALTH IN CODE, S.L

Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España

+34 963 212 340 - info@healthincode.com

healthincode.com

Código: HIC-PT-KIT 03-F-03

healthincode

Health in Code S.L. 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 uso en investigación. Health in Code S.L. 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 Health in Code S.L., 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. Health in Code S.L. 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 Health in Code S.L. son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit **Imegen® Inv16** 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:



+34 963 212 340



tech.support@healthincode.com

Imegen® es una marca registrada de Health in Code S.L. en España.

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)		
Versión 05	MAR 2023	Se modifica el nombre de la enzima en las secciones 5 y 6.
Versión 04	DIC 2022	Cambio de dirección del fabricante: Health in Code S.L., Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España.
Versión 03	SEP 2022	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a HEALTH IN CODE, S.L.
Versión 02	ENE 2019	Revisión de contenido.

índice

01	Información General	4
02	Uso previsto	5
03	Advertencias y precauciones de seguridad	6
04	Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	7
05	Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran	8
06	Protocolo de ensayo	9
06.1	Preparación de los reactivos	9
06.2	Preparación de las curvas patrón	9
06.3	Preparación de las reacciones de amplificación	10
06.4	Configuración del programa de PCR	11
07	Análisis de los resultados	12
08	Troubleshooting	16
09	Limitaciones	17
09.1	Equipos	17
09.2	Reactivos	17
09.3	Estabilidad del producto	17

01 Información general

El gen CFBF, localizado en la región cromosómica 16q22, codifica la subunidad beta de un factor de transcripción mientras que el gen colindante MYH11 se encuentra en la región cromosómica 16p13. Como resultado de la fusión de ambos genes, se genera el gen de fusión CFBF-MYH11, resultante de reordenamientos entre puntos de ruptura entre los genes CFBF y MYH11, dando como resultado la inversión pericéntrica del cromosoma 16, también Inv16.

La alteración del gen CFBF bloquea la diferenciación de las células sanguíneas y conduce a la producción de células mieloblastoides. Dada la variabilidad en los puntos de ruptura entre *CBFB* y *MYH11*, más de 10 transcriptos de fusión *CBFB-MYH11* han sido descritos, entre los cuales el Tipo A representa una frecuencia superior al 85% de las fusiones. Dicho reordenamiento está asociado a una prognosis favorable en pacientes de Leucemia Mieloide Aguda (AML).

Además, el oncogén CFBF-MYH11 está asociado a una prognosis intermedia cuando ocurre en combinación con mutaciones en el gen KIT.

Referencias

- > *Comprehensive Analysis of CFBF-MYH11 Fusion Transcripts in Acute Myeloid Leukemia by RT-PCR Analysis. ShriHari S. Kadkol, Annette Bruno, Carol Dodge, Valerie Lindgren, and Farhad Ravandi. J Mol Diagn. 2004 Feb; 6(1): 22-27*

02 Uso previsto

El kit **Imegen® Inv16** emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis para la amplificación y cuantificación del gen de fusión CFBF-MYH11 Tipo A resultante de la inversión pericéntrica del cromosoma 16, inv(16)(p13q22) mediante PCR a tiempo real. Este kit permite calcular el número de copias del reordenamiento y el número de copias del gen endógeno ABL1, comparándolo con un único plásmido que posee una copia de las dos dianas de amplificación en un ratio 1:1.

Además, este análisis genético permite al usuario detectar enfermedad mínima residual (EMR). El nivel de sensibilidad teórico que se puede alcanzar es MR4:0.01% de inv(16)(p13q22).

El límite de cuantificación (LOQ) es el valor mínimo cuantificable y coincide con el punto más diluido incluido en la curva estándar. Por tanto, el LOQ se establece en 125 copias totales tanto para el gen de referencia ABL1 como para el reordenamiento inv(16)(p13q22).

Para este estudio se necesitan 10 µL de cDNA sintetizado mediante retrotranscripción de ARN total extraído de muestras de sangre periférica.

Imegen® Inv16 es sólo para uso en investigación y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

03 Advertencias y precauciones

- ◇ Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
- ◇ No pipetear con la boca.
- ◇ No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
- ◇ Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
- ◇ 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.
- ◇ 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.
- ◇ Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
- ◇ 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.
- ◇ Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
- ◇ 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.
- ◇ El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por Health in Code S.L.

04 Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 48 reacciones de PCR a tiempo real.

La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- **Inv16 Master Mix:** Oligonucleótidos y sondas de hidrólisis (FAM™) específicos para detectar el reordenamiento inv(16)(p13q22).
- **ABL1 Master Mix:** Oligonucleótidos y sondas de hidrólisis (FAM™) específicos para detectar el gen de referencia ABL1.
- **Inv16-ABL1 Standard:** Plásmido a una concentración de 25×10^4 copias/ μ L de CBF β -MYH11 Tipo A y ABL1 en un ratio 1:1.

Reactivos	Color	Viales	Conservación
Inv16 Master Mix	Disco azul	2 x 24 reacciones	4°C
ABL1 Master Mix	Disco amarillo	2 x 24 reacciones	4°C
Inv16-ABL1 Standard	Tapa azul	4 viales	4°C

Tabla 1. Componentes del kit Imegen® Inv16

* Los reactivos de este kit están liofilizados. Una vez rehidratados, los reactivos deberán conservarse a -20°C

05 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real (canal FAM)
- Micropipetas (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- *Vortex*
- Centrifuga

Reactivos:

- *Applied Biosystems™ TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0* (ThermoFisher Scientific)
- Agua libre de nucleasas

NOTA: Además, este kit no incluye los reactivos requeridos para llevar a cabo la retrotranscripción de RNA a cDNA

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Material fungible óptico compatible con el termociclador de PCR a tiempo real
- Guantes de látex sin polvo

06 Protocolo de ensayo

06.1 | Preparación de los reactivos

Todos los reactivos incluidos en el kit están liofilizados. El primer paso antes de utilizar el kit consistirá en rehidratar los reactivos añadiendo la cantidad de agua, libre de nucleasas, recogida en la siguiente tabla. Con el objetivo de facilitar la resuspensión de cada componente, se recomienda agitar y dar un *spin* a los tubos que contienen los reactivos y conservarlos a 4°C durante una hora antes de su uso.

Reactivos	Rehidratación
<i>Inv16 Master Mix</i>	130 µL de agua/vial*
<i>ABL1 Master Mix</i>	130 µL de agua/vial*
<i>Inv16-ABL1 Standard</i>	50 µL de agua/vial*

Tabla 2. Volumen de rehidratación de los componentes del kit

(*) Si estos reactivos no van a ser utilizados tras la rehidratación, recomendamos conservarlos a -20°C.

06.2 | Preparación de las curvas patrón

Una vez rehidratado el *Inv16-ABL1 Standard*, se deben preparar diluciones seriadas 1:10 para la obtención de las curvas patrón. Estas curvas permiten cuantificar el número de copias, tanto del gen endógeno (ABL1) como el reordenamiento *inv(16)(p13q22)*. El número de copias del control positivo es de 25×10^4 copias/µL. Se recomienda preparar las diluciones del control justo antes de realizar el ensayo.

- 01 Descongelar *Inv16-ABL1 Standard*. Agitar en *vortex* y dar un *spin*.
- 02 Realizar cuatro diluciones seriadas 1:10, añadiendo 5 µL del estándar y 45 µL de agua, hasta obtener un control con una concentración de 25 copias/µL.
- 03 Después de la preparación de cada una de las diluciones, agitar en *vortex* y dar un *spin* al tubo.

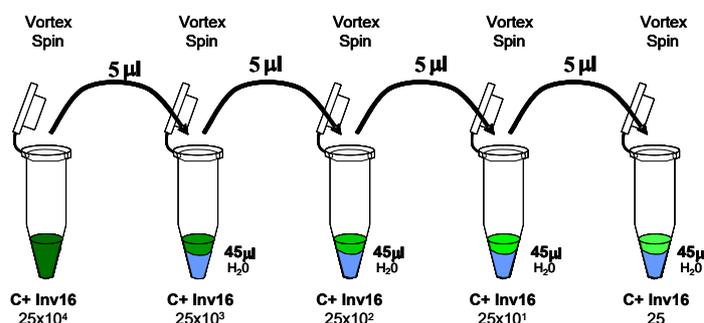


Figura 2. Resultado esperado para el control negativo (NTC)

06.3 | Preparación de las reacciones de amplificación

Para llevar a cabo el análisis con el kit Imegen® Inv16, se requiere la preparación de dos *master mix* de PCR independientes.

01 Descongelar los reactivos:

- ◇ *Inv16 Master Mix*
- ◇ *ABL1 Master Mix*
- ◇ cDNA de las muestras a analizar
- ◇ *TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0* (ThermoFisher Scientific) (no suministrado)

02 Agitar en *vortex* a cada uno de los reactivos y mantener en frío.

Añadir las cantidades necesarias de los reactivos especificados a continuación a tubos de 1.5mL. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo reactivos suficientes para analizar una reacción más, o bien calcular y añadir un exceso del 10% a cada uno de los reactivos.

NOTA: Es importante calcular los volúmenes requeridos en cada *mix* teniendo en cuenta el número de muestras que se van a analizar, las reacciones necesarias para construir la curva estándar, y analizar un control negativo de PCR (*No template control*, NTC).

Reactivos	Volumen por reacción	
	Inv16 Master Mix	ABL1 Master Mix
<i>Inv16 Master Mix</i>	5 µL	-
<i>ABL1 Master Mix</i>	-	5 µL
<i>TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 *</i>	10 µL	10 µL

(*) Ver sección "5. Equipos, reactivos y materiales que no se suministran".

03 Agitar en *vortex* los tubos que contienen los *Master Mix* de PCR y dispensar 15 µL en cada pocillo del material fungible óptico.

04 Además, añadir los siguientes reactivos en los pocillos correspondientes:

- ◇ 5 µL de cDNA de la muestra (en duplicado)
- ◇ 5 µL de cada dilución de *Inv16-ABL1 Standard*
- ◇ 5 µL de agua libre de nucleasas (Control negativo o NTC)

<i>Inv16 Master Mix</i>		<i>ABL1 Master Mix</i>	
Standard 1250000 copias totales	cDNA 1_R1	Standard 1250000 copias totales	cDNA 1_R1
Standard 125000 copias totales	cDNA 1_R2	Standard 125000 copias totales	cDNA 1_R2
Standard 12500 copias totales	cDNA 2_R1	Standard 12500 copias totales	cDNA 2_R1
Standard 1250 copias totales	cDNA 2_R2	Standard 1250 copias totales	cDNA 2_R2
Standard 125 copias totales	NTC	Standard 125 copias totales	NTC

Figura 2. Ejemplo de la plantilla de PCR. R, réplicas; NTC, no template control; Standard, *Inv16-ABL1 Standard*

05 Colocar los tubos o placas en el termociclador de PCR a tiempo real y configurar el programa de amplificación tal y como se indica en el siguiente apartado.

06.4 | Configuración del programa de PCR

- ◇ Tipo de experimento: *Quantitation- Standard curve*
- ◇ Velocidad de rampa: *Standard*
- ◇ Volumen de reacción: 20 µL
- ◇ Referencia basal ROX™: Incluida
- ◇ Fluoróforos de las sondas TaqMan®:

Sonda	Fluoróforo	Quencher
Inv16	FAM™	TAMRA*
ABL1	FAM™	TAMRA*

Tabla 3. Información de las sondas

(*) En el sistema StepOne PCR (ThermoFisher Scientific) este campo debe rellenarse como "None"

- ◇ Programa óptimo:

Campos	Etapa 1 Activación enzimática		Etapa 2 PCR	
	1 ciclo inicial	1 ciclo inicial	50 ciclos	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	1 ciclo inicial	Desnaturalización	Unión de cebadores / Extensión
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto*

Tabla 4. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne Real-time PCR Systems

(*) Detección de la fluorescencia

07 Análisis de los resultados

Para un correcto análisis de los resultados se recomienda seguir las siguientes indicaciones:

CONTROLES NEGATIVOS

- Comprobar la ausencia de amplificación en los **controles negativos (NTC)**. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el análisis para descartar que se haya producido una contaminación accidental.

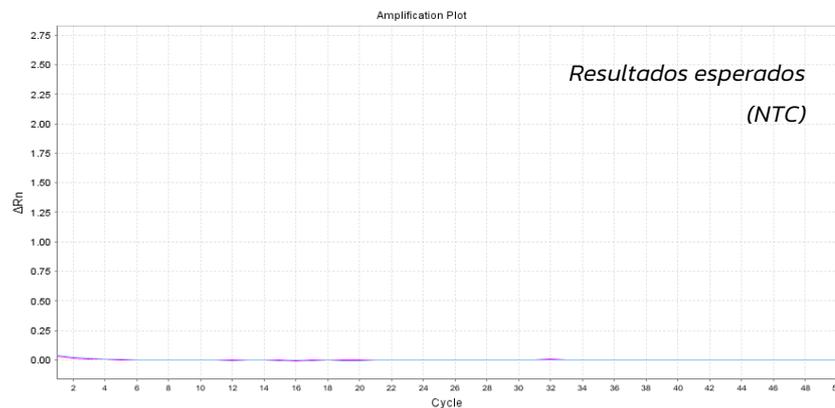


Figura 3. Resultado esperado para el control negativo (NTC)

CURVA ESTÁNDAR (*Inv16-ABL1 STANDARD*)

- Comprobar que las diluciones seriadas preparadas utilizando *Inv16-ABL1 Standard* producen curvas estándar adecuadas tanto para *Inv16 (CBFB-MYH11* tipo A) como para *ABL1*, cuando la regresión lineal se ajusta a números de copia logarítmicos:
 - ◇ Pendiente: Rango entre -3.1 y -3.7
 - ◇ Coeficiente de determinación: $R^2 > 0,980$.

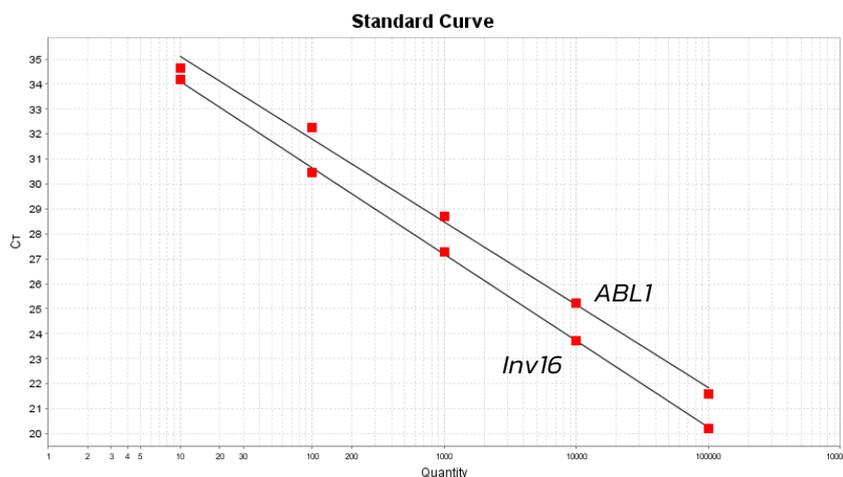


Figura 4. Regresión lineal de las curvas estándar para ABL1 e Inv16

- ➔ Si no se detecta amplificación en *Inv16-ABL1 Standard*, consultar la Sección 8 (*Troubleshooting*). La concentración más alta del estándar corresponde a 25×10^4 copias por μL (1.250.000 copias totales) y la más baja corresponde a 25 copias por μL (125 copias totales).

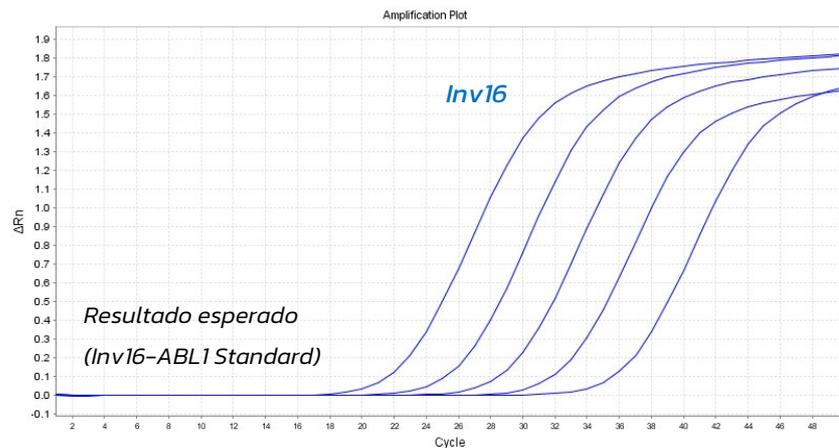


Figura 5. Diluciones seriadas utilizadas para construir la curva estándar del sistema de PCR *Inv16*

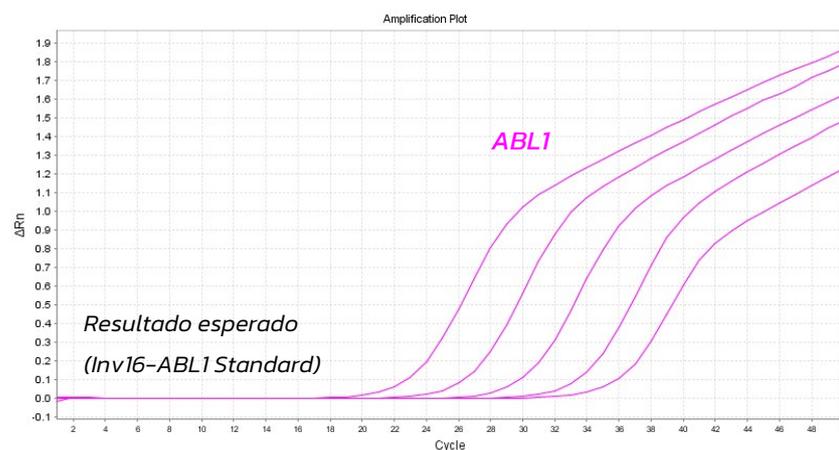


Figura 6. Diluciones seriadas utilizadas para construir la curva estándar del sistema de PCR *ABL1*

↙ MUESTRAS DE cDNA

ABL1 Master Mix

- ➔ Comprobar que en todas las muestras se detecta el gen de referencia (*ABL1*) en las reacciones preparadas con el *ABL1 Master Mix*. *ABL1* es un gen que se expresa constitutivamente, por tanto, la amplificación del gen endógeno permite comprobar que en la muestra existe suficiente cantidad de cDNA y de una calidad apropiada.

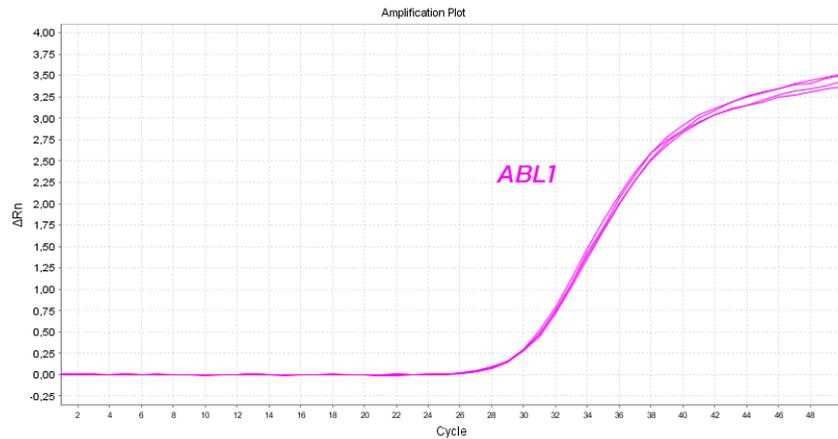


Figura 7. Resultado esperado con el sistema ABL1 para una muestra de cDNA de buena calidad.

Inv16 Master Mix & ABL1 Master Mix

➔ Tras la verificación de todos los controles, se analizan las muestras de cDNA. La muestra analizada presenta la translocación de inv(16)(p13q22), si se detecta amplificación en las reacciones preparadas con el *Inv16 Master Mix*, como se indica a continuación.

◇ Muestra negativa:

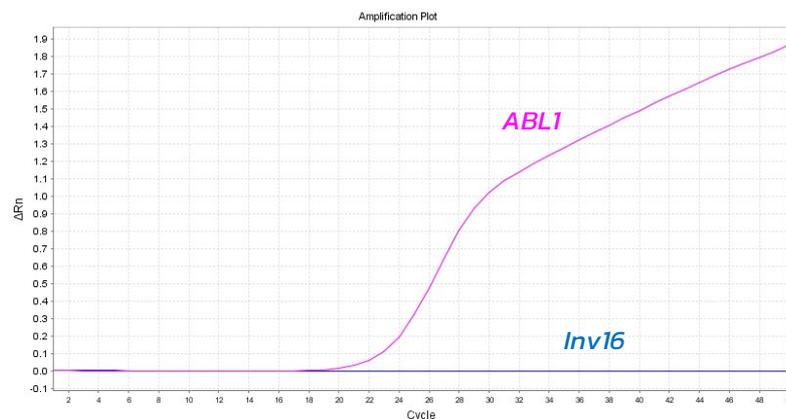


Figura 8. Resultado esperado en muestras de cDNA no patológicas. El sistema ABL1 amplificará dicho gen, pero el sistema Inv16 no amplificará dicho oncogén.

◇ Muestra positiva:

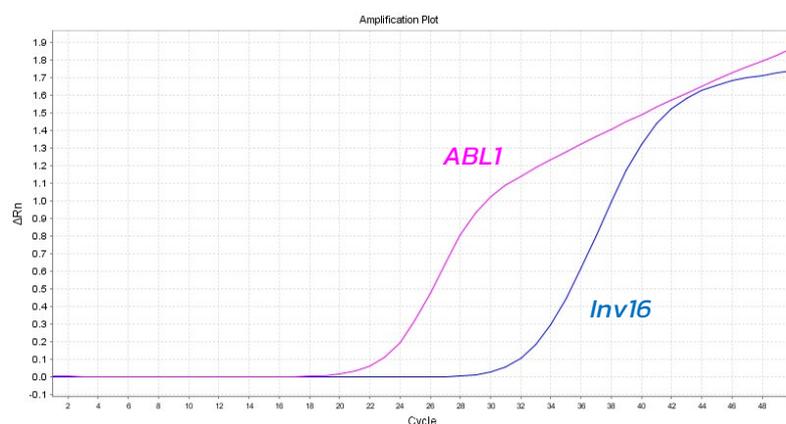


Figura 9. Resultado esperado en muestras de cDNA patológicas. Ambos sistemas amplificarán sus dianas, tanto el gen ABL1 como el oncogén CFBF-MYH11 Tipo A.

- ↳ Para calcular el número de copias normalizado (NCN) se calculará el número de copias del gen de referencia (*ABL1*) y del reordenamiento *inv(16)(p13q22)*. La cuantificación del reordenamiento (NCN) se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$NCN = \frac{Inv16_{CN}}{ABL1_{CN}}$$

NCN = Número de copias normalizado

08 Troubleshooting

La siguiente tabla representa los resultados que podrían obtenerse usando los controles positivos (*Inv16-ABL1 Standard*), negativos y las muestras de cDNA. En caso de que se obtenga un resultado inesperado, la interpretación del resultado y la razón más probable de tal resultado se recogen en la siguiente tabla:

Control / Muestra	Inv16	ABL1	Resultado / Interpretación
(Inv16-ABL1 Standard)	+	+	Resultado esperado
	-	-	
	+	-	Fallo en la configuración de la PCR ¹
	-	+	
Muestra cDNA	-	+	Resultado esperado
	+	+	
	+	-	Fallo en la configuración de la PCR ¹
	-	-	Fallo de amplificación de las muestras de cDNA ²
Control Negativo (NTC)	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación con cDNA humano o con el estándar ³

Tabla 5. Interpretación de los posibles resultados obtenidos utilizando el kit Imegen® Inv16

(1) **Fallo en la configuración de la PCR:** un error en la amplificación puede deberse a un problema técnico durante la configuración de la PCR. Verifique el programa de amplificación y la configuración de la detección de fluorescencia.

(2) **Fallo de amplificación de la muestra de cDNA:** un fallo de amplificación del gen de referencia en la muestra de cDNA podría sugerir que la cantidad o la calidad de la muestra de cDNA está comprometida. En esta situación, se recomendaría un segundo análisis, extracción de ARN o síntesis de muestras nuevas de cDNA antes de realizar una interpretación de los resultados.

(3) **Contaminación con cDNA humano o con el control positivo (Standard):** la contaminación de la PCR podría ser causada por un manejo inadecuado de la muestra, el uso de reactivos contaminados o por una contaminación ambiental. Para resolver este problema, se recomienda una limpieza completa del laboratorio donde se preparan las PCR, incluido el equipo y el material utilizado. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR y prepare finalmente las reacciones de PCR que contienen los controles positivos para evitar cualquier contaminación cruzada.

09 Limitaciones

09.1 | Equipos

Imegen® Inv16 ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR a tiempo real:

- + *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (ThermoFisher Scientific)
- + *7500 FAST Real-Time PCR System* (ThermoFisher Scientific)

Técnicamente, el kit es compatible con cualquier equipo de PCR a tiempo real que permita la detección de fluorescencia emitida por el fluoróforo FAM™.

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

09.2 | Reactivos

Imegen® Inv16 se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y las ADN polimerasas recomendadas por el fabricante de los termocicladores de PCR a tiempo real utilizados en la validación:

- + *M-MLV RT* (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase).
- + *TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0* (ThermoFisher Scientific)

Si va a utilizar una enzima de PCR diferente de la ADN polimerasa utilizada en la validación para realizar el análisis, se recomienda realizar una validación previa con los nuevos reactivos. Por favor, contacte a nuestro equipo de Soporte Técnico si necesita más información.

Además, este kit no incluye los reactivos para la extracción de ARN o la retrotranscripción de ARN a cDNA. Para obtener resultados óptimos, se recomienda seguir las guías locales para el análisis de Inv16.

09.3 | Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas en la sección 4 (Contenido y condiciones de almacenamiento del kit) de este manual.

Contacte con nuestro Departamento Técnico para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos:

✉ tech.support@healthincode.com

☎ +34 963 212 340

healthincode



Descubre todos nuestros
kits de diagnóstico

