Instrucciones de uso

Imegen® BCR-ABL1 Screening

Ref. IMG-108

CE IVD

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 V.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 diagnóstico *in vitro*. 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 estos, 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® BCR-ABL1 Screening ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.

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 08	NOV 2023	Revisión del documento y corrección de fallo editorial en apartado 3. Se añade apartado 11 Características de rendimiento.
Versión 07	AGO 2023	Se renombra la enzima en los apartados 3, 6, 7 y 10
Versión 06	NOV 2022	Cambio de dirección del fabricante: Health in Code S.L., Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España.
Versión 05	SEP 2022	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a HEALTH IN CODE, S.L.
Versión 04	MAR 2021	Corrección nomenclatura muestras de referencia utilizadas, en Apartado 3.

índice

01 **Información general** 4

02 **Uso previsto** 5

03 **Características técnicas** 6

04 **Advertencias y precauciones de seguridad** 7

05 **Contenido y condiciones de almacenamiento del kit** 8

06 **Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran** 9

07 **Protocolo de ensayo** 10

07.1 | Preparación de los reactivos 10

07.2 | Preparación de las reacciones de amplificación 10

07.3 | Configuración del programa de la PCR a tiempo real 11

08 **Análisis de los resultados** 13

09 **Troubleshooting** 16

10 **Limitaciones** 17

10.1 | Equipos 17

10.2 | Reactivos 17

10.3 | Estabilidad del producto 17

11 **Características de rendimiento** 18

11.1 | Muestras de validación 18

11.2 | Límite de detección (LOD) 18

11.4 | Reproducibilidad y repetibilidad 18

01 Información general

La translocación entre los genes *BCR* y *ABL1* o translocación del cromosoma Filadelfia es una alteración génica que suele estar presente en la mayoría de los pacientes con leucemia mieloide crónica (CML) y en algunos pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL). La detección de este reordenamiento está asociada a una prognosis favorable en los pacientes.

La fusión de los genes *BCR*, localizado en el cromosoma 22, y *ABL1*, localizado en el cromosoma 9, da lugar a un oncogén (BCR-ABL1) que produce una proteína anormal. Esta proteína da lugar a una actividad tirosina quinasa aumentada que produce el crecimiento anormal y fuera de control de linfocitos, desencadenando en leucemia.

Según donde se genere el punto de rotura dentro del gen *BCR*, se generan distintos reordenamientos. Existen tres formas principales del oncogén quimérico BCR-ABL1:

- **M-BCR-ABL1 (región mayor)**: cuando se fusionan b3a2 o b3a3 y b2a2 o b2a3 dando lugar a una tirosina quinasa quimérica de 210 kDa (p210)
- **m-BCR-ABL1 (región menor)**: cuando se fusionan e1a2 o e1a3 dando lugar a una tirosina quinasa quimérica de 190 kDa (p190)
- **p230**: cuando se fusionan e19a2 o e19a3 dando lugar a una tirosina quinasa quimérica de 230 kDa.

Además, en la bibliografía se han descrito otros reordenamientos mucho menos frecuentes, los cuales no se estudian en este ensayo:

- e6a2 o e6a3
- e8a2 o e8a3

Referencias

> *https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/bcr-abl/ERM-AD623-BCR-ABL-pDNA-CALIBRANT/ERM-AD623*

> *Leukemia. 2003; Volume 17: 2318-2357. doi:10.1038/sj.leu.2403135*

02 Uso previsto

Imegen® BCR-ABL1 Screening emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes validadas mediante PCR a tiempo-real para amplificar las variantes más frecuentes del reordenamiento BCR-ABL1 (M-BCR-ABL1 y m-BCR-ABL1) y el gen de referencia *ABL1*. Este análisis permitirá determinar la presencia o no de dichas translocaciones, pero no determinar cuál de ellas está presente en la muestra ni en qué proporción, puesto que se trata de un análisis cualitativo.

El tipo de muestra necesaria para este estudio es ADN complementario (cDNA). Previa obtención del cDNA, se deberá extraer el ARN total de las células de muestras de sangre periférica o médula ósea, a partir del cual poder realizar la retrotranscripción a cDNA.

Se recomienda consultar el manual de procedimientos *"Estudio molecular del reordenamiento BCR-ABL1"* publicado por el grupo de Biología Molecular en Hematología (GBMH) para una preparación óptima de la muestra de cDNA.

Los resultados permitirán orientar al clínico en el diagnóstico del tipo de leucemia que padece el paciente.

Imegen® BCR-ABL1 Screening es sólo para uso en diagnóstico *in vitro* y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

03 Características técnicas

Imegen® BCR-ABL1 Screening ha sido validado utilizando muestras de cDNA sintetizadas por retrotranscripción total de RNA extraído a partir de sangre periférica de pacientes sanos y diagnosticados con leucemia mieloide crónica, detectando específicamente los productos de fusión y el gen de referencia *(ABL1)* definidos en la Sección 2 de este documento (Uso previsto).

La validación de Imegen® BCR-ABL1 Screening se ha realizado utilizando los siguientes reactivos no incluidos en el kit:

- ***M-MLV RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)***. Retrotranscripción llevada a cabo usando 1 µg de RNA total.
- ***Master Mix* de *PCR Hot Start (TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0,*** ThermoFisher Scientific)

Siguiendo el protocolo especificado en la Sección 7 (Protocolo de ensayo) se ha establecido el límite de detección (LOD) de ABL1 y de M-BCR en 5 copias totales utilizando un vector sintético calibrado con Material de Referencia del IRMM (*ERM®-AD623)*. El LOD de m-BCR se ha establecido en 10 copias totales, utilizando un plásmido sintético que contiene m-BCR y ABL1.

04 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
- El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por Health in Code S.L., por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.

05 Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

El kit contiene los siguientes reactivos necesarios para llevar a cabo 48 reacciones de PCR a tiempo real por cada una de las dos dianas analizadas en este kit:

- ***BCR Screening Master Mix***: mezcla de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis (FAM™) específicos para detectar los reordenamientos M-BCR-ABL1 y m-BCR-ABL1 simultáneamente.
- ***ABL1 Master Mix***: mezcla de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis (FAM™) específicos para detectar el gen de referencia *ABL1*.
- ***Positive Control:*** Un control positivo de la translocación BCR-ABL1 y de *ABL1*.

Tabla 1. Componentes del kit Imegen® BCR-ABL1 Screening

Reactivos	Color	Viales	Conservación
BCR Screening Master Mix	Disco rojo	2 x 24 reacciones	4ºC
ABL1 Master Mix	Disco amarillo	2 x 24 reacciones	4ºC
Positive Control	Tapa roja	1 vial	4ºC

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

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real
- Micropipetas (10 µL, 20 µL y 200 µL)
- *Vortex*

Reactivos:

- Agua libre de nucleasas
- *Master Mix* de *PCR Hot Start (TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0, Thermo Fisher Scientific)*

NOTA: Además este kit no incluye los reactivos necesarios para llevar a cabo la retrotranscripción del ARN a cDNA

Materiales:

- Tubos ópticos de 0.2 mL
- Tapas ópticas para tubos de 0.2 mL
- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL y 200 µL)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Guantes de látex sin polvo

Kits complementarios

Si los resultados del screening de reordenamientos BCR-ABL1 resultan positivos para alguna de las muestras analizadas, Health in Code, S.L. ofrece los kits:

- IMG-121 Imegen® M-BCR-ABL1
- IMG-122 Imegen® m-BCR-ABL1

Además, Imegen® M-BCR-ABL1 ofrece un ensayo preciso y sensible calibrado con el **Material de Referencia Certificado (ERM-AD623a-f)** para la estandarización de la evaluación de la **Respuesta Molecular (MR)**.

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de los reactivos

Todos los reactivos incluidos en el kit están liofilizados. El primer paso antes de utilizar cualquiera de nuestros kits 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.

Tabla 2. Volumen de rehidratación de los componentes del kit

Reactivos	Rehidratación
BCR Screening Master Mix	130 µL de agua/vial*
ABL1 Master Mix	130 µL de agua/vial*
Positive Control	100 µL de agua/vial*

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

07.2 | Preparación de las reacciones de amplificación

El protocolo de preparación de las reacciones se muestra a continuación:

01 Descongelar los reactivos necesarios para el análisis:

- *BCR Screening Master Mix / ABL1 Master Mix*
- *Positive Control*
- Muestras de cDNA sin diluir
- Agua libre de nucleasas para el control de PCR (CPCR)
- *Master Mix* de *PCR Hot Start (TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0,* Thermo Fisher Scientific) (no suministrado)

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

03 Añadir las cantidades necesarias de los reactivos especificados a continuación, a tubos de 1,5 ml. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo reactivos suficientes para analizar una reacción más, o bien calcular y añadir un 10% más de cada uno de los reactivos:

Master Mix BCR-ABL1 (Oncogén)

Reactivo	Volumen por reacción
BCR Screening Master Mix	5 µL
*TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0**	10 µL

(*) Ver sección "6. Equipos, reactivos y materiales que no se suministran".

Master Mix ABL1 (Gen de referencia)

Reactivo	Volumen por reacción
ABL1 Master Mix	5 µL
*TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0**	10 µL

(*) Ver sección "6. Equipos, reactivos y materiales que no se suministran".

Los volúmenes requeridos para cada *mix* deben ser calculados para el número total de muestras que se vayan a incluir en el estudio. Además, se debe de calcular un extra de reactivos para incluir los controles positivos y los controles de PCR (CPCR)

04 Agitar en *vortex* los *mix* de PCR y pipetear 15 µl en cada pocillo.

05 Una vez las mixes se hayan dispensado, añadir los siguientes volúmenes en los pocillos correspondientes:

- 5 µL de la muestra de cDNA
- 5 µL del Control BCR-ABL1 (Control positivo)
- 5 µL de agua libre de nucleasas (Control de PCR, CPCR)

BCR Screening Master Mix	
cDNA muestra 1	Control Positivo
cDNA muestra 2	NTC
cDNA muestra 3	
cDNA muestra 4	

ABL1 Master Mix	
cDNA muestra 1	Control Positivo
cDNA muestra 2	NTC
cDNA muestra 3	
cDNA muestra 4	

Figura 1. Ejemplo de una posible disposición de la placa para la PCR a tiempo real.

07.3 | Configuración del programa PCR a tiempo real

Para llevar a cabo la PCR a tiempo real, se deberán de seguir las siguientes instrucciones para configurar el programa de amplificación:

7500 Fast o StepOne Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific)

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

Tabla 3. Información de las sondas

Sonda	Fluoróforo	*Quencher*
BCR-ABL1	FAM™	TAMRA*
ABL1	FAM™	TAMRA*

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

Programa óptimo:

Tabla 4. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne

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

(*) Detección de la fluorescencia

08 Análisis de los resultados

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

CONTROLES NEGATIVOS (CPCR)

- Comprobar que en los **Controles Negativos** no hay amplificación. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el análisis para descartar que se haya producido una contaminación accidental.

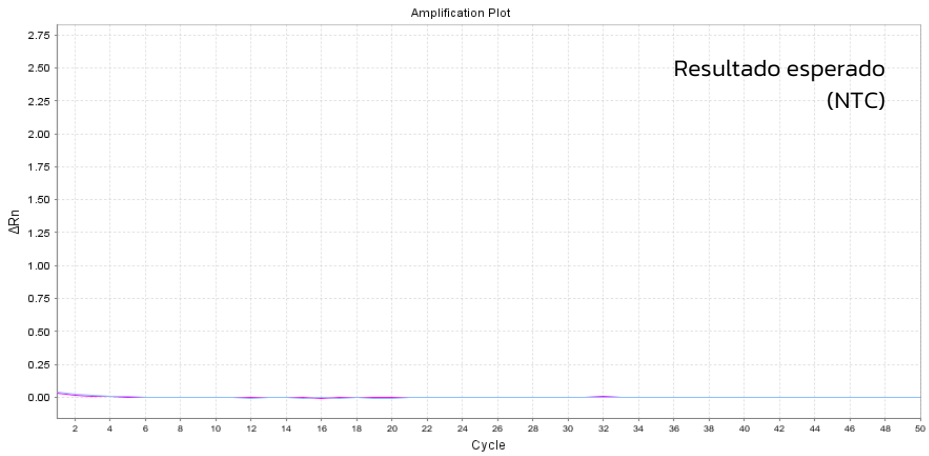

Figura 2. Resultado esperado para el control negativo (NTC).

CONTROL POSITIVO

- Comprobar que el **Control Positivo** se amplifica en las dos reacciones. En caso negativo, se recomienda repetir el análisis para descartar que se haya producido algún error en la preparación de las reacciones.

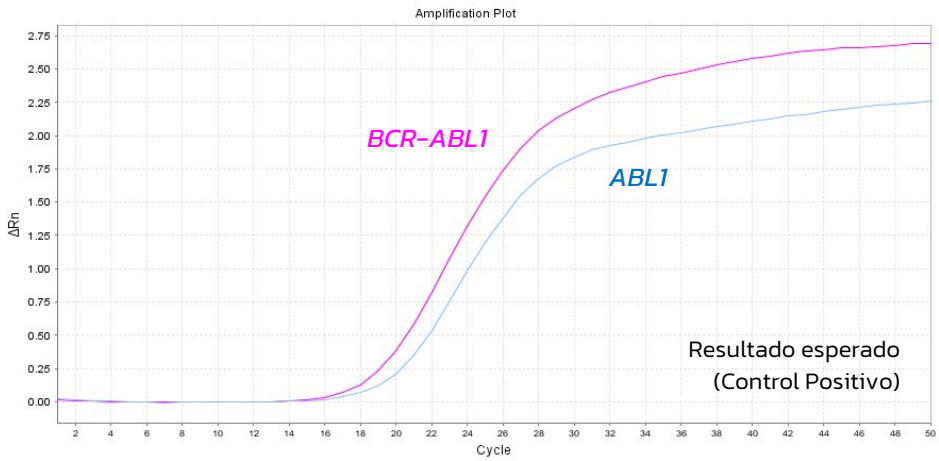

Figura 3. Resultado esperado para el control positivo.

MUESTRAS (cDNA)

ABL1 Master Mix

- Comprobar que se detecta el gen de referencia en todas las muestras analizadas con el ***ABL1 Master Mix***. Esta reacción permite comprobar que en la muestra existe suficiente cantidad de cDNA y de una calidad apropiada.

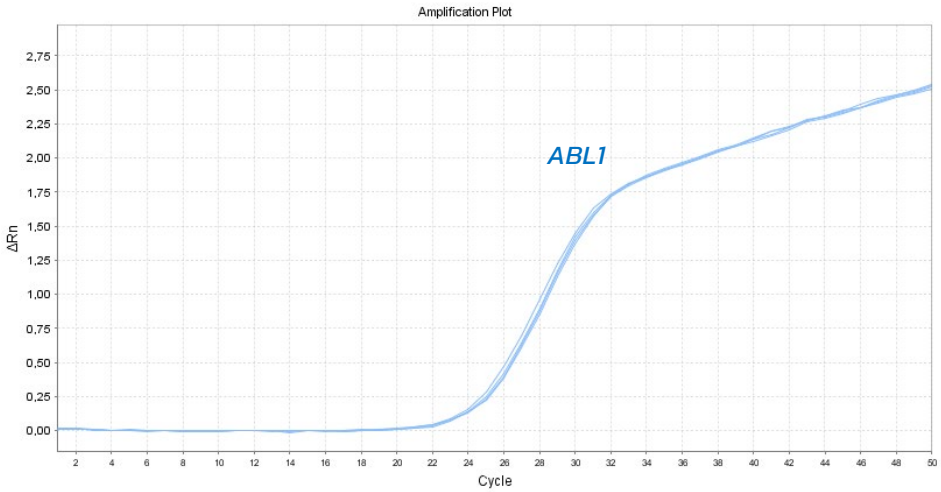

Figura 4. Resultado esperado con el sistema ABL1 para una muestra de cDNA de buena calidad.

BCR Screening Master Mix & ABL1 Master Mix

- Tras la verificación de todos los controles, se analizará cada una de las muestras. La muestra posee el reordenamiento si se detecta amplificación con el *BCR-ABL1 Master Mix*.

  - Muestra negativa:

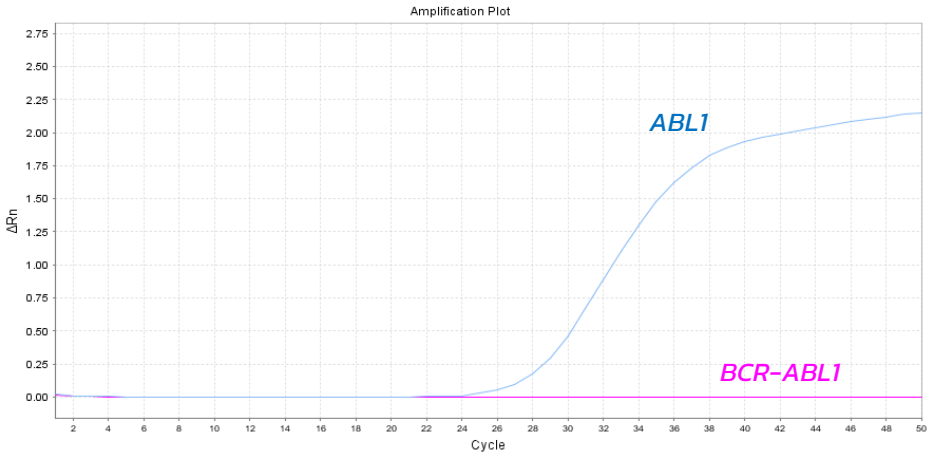

Figura 5. Resultado esperado en muestras de cDNA no patogénicas. El sistema ABL1 amplificará dicho gen, pero el sistema BCR Screening no amplificará el oncogén BCR-ABL1.

- Muestra positiva:

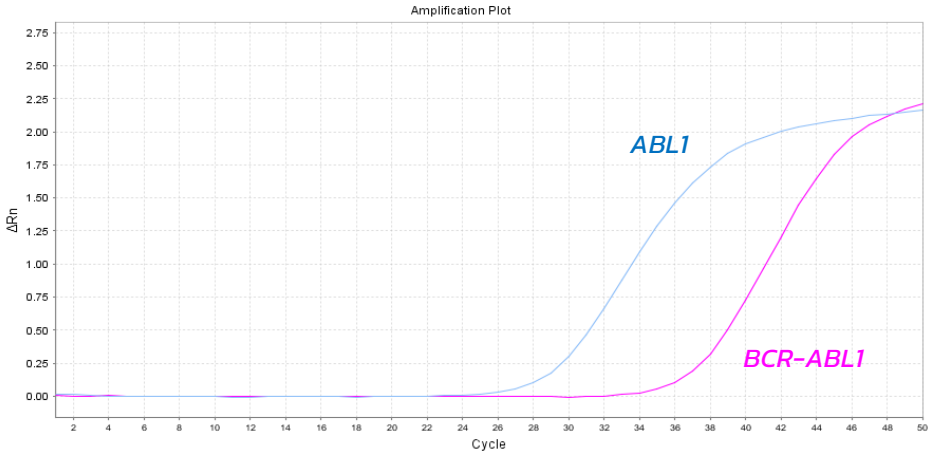

Figura 6. Resultado esperado en muestras de cDNA patogénicas. Ambos sistemas amplificarán sus dianas, tanto el gen ABL1 como el oncogén BCR-ABL1

09 Troubleshooting

La tabla que aparece a continuación presenta gráficamente los resultados que podrían obtenerse del análisis de los diferentes controles y una muestra en un ensayo, así como su interpretación.

Tabla 5. Interpretación de los posibles resultados del kit imegen® BCR-ABL1 Screening

Controles y muestras	BCR-ABL1	ABL1	Causa
Control positivo	+	+	Resultado esperado
	–	–	Fallo de amplificación de la PCR [1]
Muestra a analizar	–	+	Resultado esperado
	+	+	
	–	–	Fallo en la amplificación de la muestra [2]
Control negativo de PCR	–	–	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con ADN humano o control positivo [3]

(1) Fallo de amplificación en 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 en la amplificación de la muestra: 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 de la PCR con ADN de humano o control positivo: 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.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

Imegen® BCR-ABL1 Screening ha sido validado con los siguientes equipos de PCR a tiempo real:

- *7500 FAST Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific)
- *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific)

Técnicamente, este kit es compatible con todas las plataformas de PCR a tiempo real que detecten la fluorescencia FAM.

Si usa una marca o modelo de termociclador distintos a las mencionadas anteriormente, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro servicio técnico para cualquier consulta o aclaración.

10.2 | Reactivos

El kit Imegen® BCR-ABL1 Screening ha sido validado con 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).
- *Master Mix* de *PCR Hot Start (TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0* (Thermo Fisher Scientific)

Si utiliza 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 con nuestro servicio técnico para cualquier consulta o aclaración.

Además, este kit no incluye los reactivos necesarios para la retrotranscripción del ARN a cDNA. Se recomienda utilizar un protocolo que parta de 1 µg de ARN para llevar a cabo la retrotranscripción.

10.3 | Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas en la sección 5 (Contenido y almacenamiento del kit) de este manual.

11 Características de rendimiento

11.1 | Muestras de validación

El kit Imegen® BCR-ABL1 Screening para qPCR está diseñado para el análisis de ADN complementario (ADNc) procedentes de sangre periférica o médula ósea.

Los ensayos han sido validados con dos muestras de ADN sintético (plásmidos) y 13 muestras de ADNc cuyo genotipo ha sido previamente analizado para identificar las variantes más frecuentes del reordenamiento BCR-ABL1 (M-BCR-ABL1 o m-BCR-ABL1).

11.2 | Límite de detección (LOD)

El límite de detección del kit Imegen® BCR-ABL1 Screening para qPCR se evaluó mediante la preparación de diluciones seriadas de los plásmidos sintéticos *pMajor* y *pMinor* hasta obtener 10 y 5 copias totales.

Como criterio de aceptación se evalúa el coeficiente de variación (CV) que debe ser <25% entre las 11 réplicas con *pMinor* a 10 copias totales y con *pMajor* a 5 copias totales.

11.3 | Reproducibilidad y repetibilidad

Para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad se preparan los plásmidos *pMajor* y *pMinor* al límite de detección (LOD=5 para *pMajor* y LOD = 10 para *pMinor*) y se realizan los ensayos de repetibilidad cargando 11 réplicas en dos equipos diferentes de qPCR (7500 FAST Real-Time PCR System y StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Thermo Fisher Scientific).

El criterio de aceptación de reproducibilidad y repetibilidad es un CV inferior al 25% para ambos ensayos. Los resultados obtenidos tienen un CV inferior al 25% utilizando dos equipos diferentes de qPCR en días diferentes y entre las 11 réplicas de un mismo ensayo.

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