



Instrucciones de uso

Imegen[®] PML-RARA Screening

Ref. IMG-130



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® PLM-RARA 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	DIC 2023	Revisión y actualización del apartado "3. Características técnicas".
Versión 07	AGO 2023	Se renombra la enzima en los apartados 6, 7 y 10.
Versión 06	MAR 2023	Cambio del nombre de la enzima no suministrada en las secciones 6, 7 y 10.
Versión 05	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 04	SEP 2020	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a HEALTH IN CODE, S.L.
Versión 03	FEB 2019	Actualización del documento por marcado CE-IVD del producto.

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

01 Información general

La translocación t(15; 17) (q22; q21) se produce entre los cromosomas 15 y 17 y da lugar a la fusión del gen del receptor alfa del ácido retinoico (RARA) situado en el cromosoma 17 y del gen *PML* situado en el cromosoma 15.

El gen *PML*, codifica una proteína que actúa como un supresor de tumor, mientras que el oncogén de fusión *PML-RARA* es incapaz de bloquear la proliferación celular o inducir la apoptosis y ejerce sus efectos oncogénicos mediante la represión de la expresión de genes AR-inducibles críticos para la diferenciación mieloide.

El 95% de los casos de Leucemia Promielocítica Aguda (APL), un tipo de leucemia mieloide aguda posee una translocación *PML-RAR α* la cual está asociada a una prognosis favorable.

Dada la variabilidad en los puntos de ruptura en *PML* (intrón 6, exón 6 o intrón 3), tres transcritos de fusión de *PML-RAR α* : *bcr1*, *bcr2* y *bcr3*, han sido identificados. Representan el 55%, 5% y 40% de los casos de APL, respectivamente.

Se encuentra en el 95% de las leucemias agudas promielocíticas (APL), donde *PML-RARA* ejerce sus efectos oncogénicos mediante la represión de la expresión de genes AR-inducibles críticos para la diferenciación mieloide.

Referencias

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

02 Uso previsto

Imegen® PML-RARA Screening emplea una combinación de cebadores y sondas de hidrólisis fluorescentes validadas mediante PCR a tiempo-real para amplificar las variantes *bcr1*, *bcr2* y *bcr3* del reordenamiento *PML-RARα*, resultantes de la translocación entre el cromosoma 15 y 17, *t(15;17)(q22q21)*, y el gen de referencia *GUS*. Este análisis permitirá detectar la presencia o no de dichas translocaciones, sin embargo, no permite discriminar 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 retro transcripción a cDNA.

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

Imegen® PML-RARA Screening es sólo para uso en diagnóstico *in vitro* y están dirigidos a profesionales del sector de la biología molecular.

03 Características técnicas

Imegen® PML-RARA 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 Promielocítica Aguda (LPA), detectando específicamente los productos de fusión y el gen de referencia *GUS* definidos en la Sección 2 de este documento (Uso previsto).

El límite de detección, tanto de la diana *PML-RARA* como de *GUS* es de 5 copias absolutas.

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:

- ***PML-RARA Screening Master Mix***: oligonucleótidos y sonda de hidrólisis (FAM™) específicos que permite detectar los reordenamientos bcr1, bcr2 y bcr3 de *PML-RARA* simultáneamente.
- ***GUS Master Mix***: oligonucleótidos y sonda de hidrólisis (FAM™) específicos que permite detectar la presencia del gen de referencia *GUS*.
- ***Positive Control***: un control positivo de la translocación bcr1, bcr2, bcr3 y *GUS*.

Reactivos	Color	Viales	Conservación
<i>PML-RARA Screening Master Mix</i>	Disco morado	3 x 16 reacciones	4°C
<i>GUS Master Mix</i>	Disco amarillo	3 x 16 reacciones	4°C
<i>Positive Control</i>	Tapa morada	1 vial	4°C

Tabla 1. Componentes del kit Imegen® PML-RARA Screening

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

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real
- Micropipetas (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- *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 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Guantes de látex sin polvo

Kits complementarios

Si los resultados del screening de reordenamientos *PML-RAR α* resultan positivos para alguna de las muestras analizadas, Health in Code, S.L. ofrece el kit **Imegen® PML-RARA** (Ref.: IMG-111)

Este kit permite la cuantificación del transcrito de fusión de *PML-RAR α* más común: *bcr1*, el cual representa el 55% de los casos de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) con *t(15;17)(q22q21)*.

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.

Reactivos	Rehidratación
<i>PML-RARA Screening Master Mix</i>	90 µL de agua/vial*
<i>GUS Master Mix</i>	90 µL de agua/vial*
<i>Positive Control</i>	100 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.

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, incluyendo:
 - ◇ *PML-RARA Screening Master Mix / GUS 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* a cada uno de los reactivos y mantener en frío.
- 03 Se deberán preparar máster mixes independientes para realizar el análisis del gen de referencia GUS y del oncogén PML-RARA. Para ello, se preparan máster mixes independientes en tubos de 1.5 mL de acuerdo con las siguientes tablas:

➤ *Master Mix PML-RARA (Oncogén)*

Reactivos	Volumen por reacción
<i>PML-RARA Screening Master Mix</i>	5 µL
<i>TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 *</i>	10 µL

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

➤ **Master Mix GUS (Gen endógeno)**

Reactivos	Volumen por reacción
<i>GUS Master Mix</i>	5 µL
<i>TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 *</i>	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)

NOTA: 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.

- 04 Agitar en *vortex* a 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 PML-RARA (Control positivo)
 - ◇ 5 µL de agua libre de nucleasas (Control de PCR, CPCR)

<i>PML-RARA Screening Master Mix</i>		<i>GUS Master Mix</i>	
cDNA muestra 1	Control Positivo	cDNA muestra 1	Control Positivo
cDNA muestra 2	CPCR	cDNA muestra 2	CPCR
cDNA muestra 3		cDNA muestra 3	
cDNA muestra 4		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™: Includida
- ◇ Fluoróforos de las sondas TaqMan®:

Sonda	Fluoróforo	Quencher
PML-RARA	FAM™	TAMRA*
GUS	FAM™	TAMRA*

Tabla 3. Información de las sondas

(*). En el sistema StepOne PCR (Thermo Fisher 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

(*) 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.

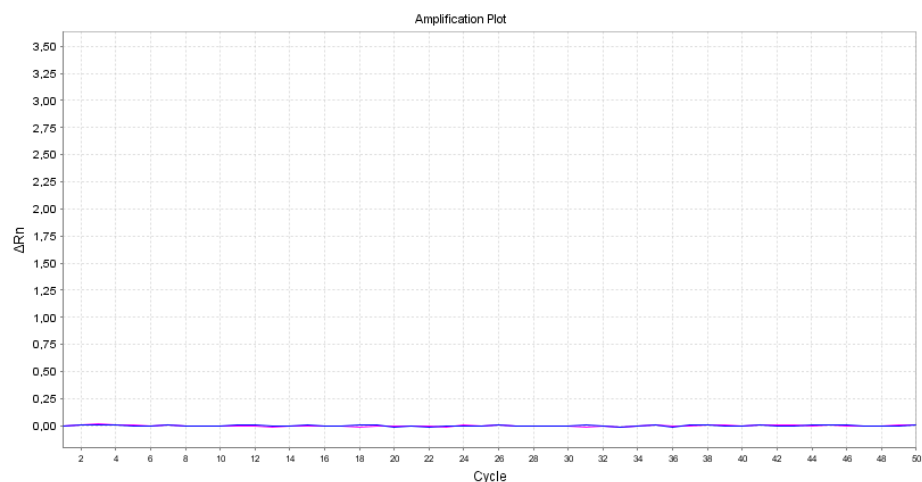


Figura 2. Resultado esperado para el control negativo (NTC)

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.

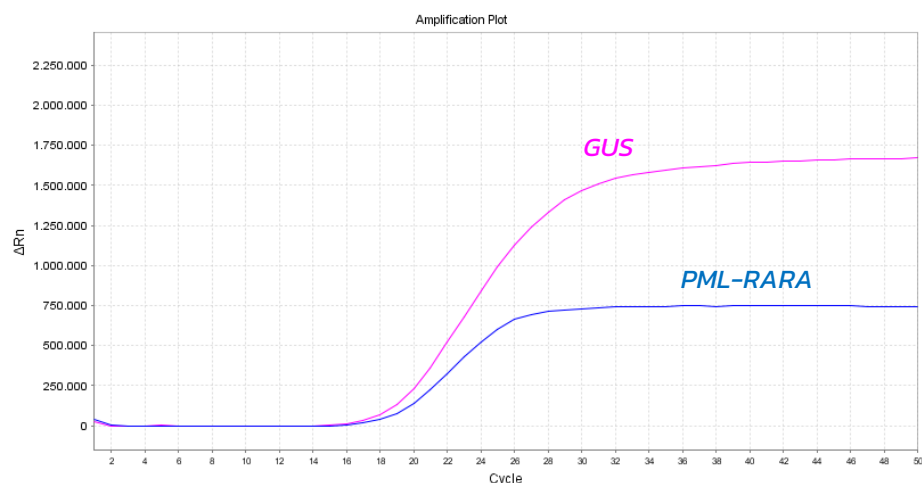


Figura 3. Resultado esperado para el control positivo

▾ MUESTRAS (cDNA)

GUS Master Mix

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

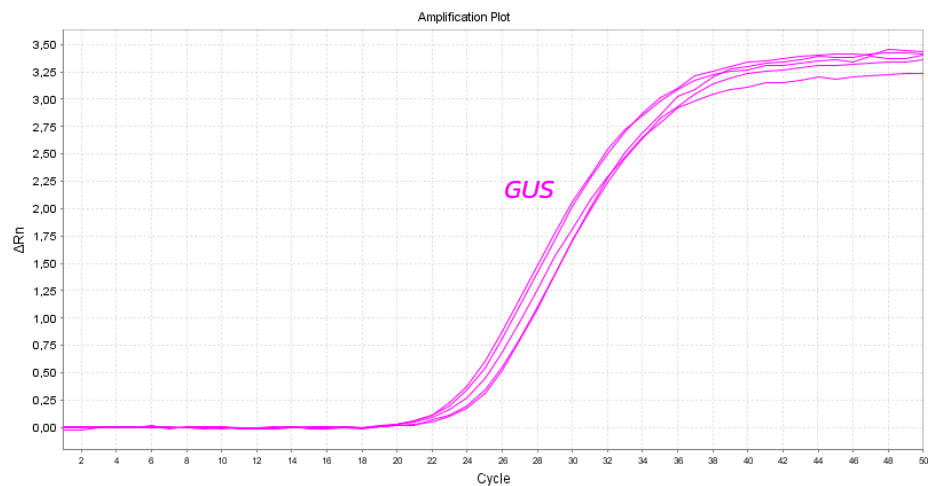


Figura 4. Resultado esperado con el sistema GUS para una muestra de cDNA de buena calidad.

PML-RARA Screening Master Mix & GUS 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 *PML-RARA Screening Master Mix*.

◇ Muestra negativa:

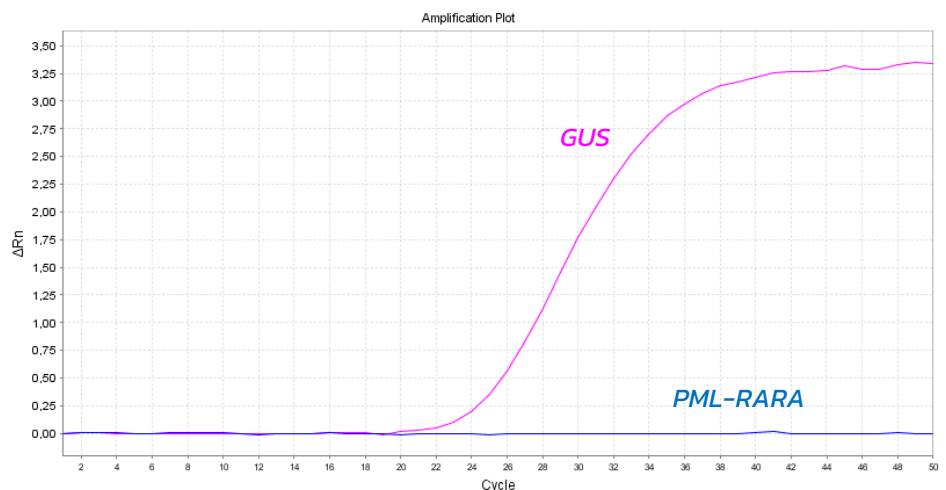


Figura 5. Resultado esperado en muestras de cDNA no patológicas. El sistema GUS amplificará dicho gen, pero el sistema PML-RARA Screening no amplificará el oncogen PML-RARA.

◇ Muestra positiva:

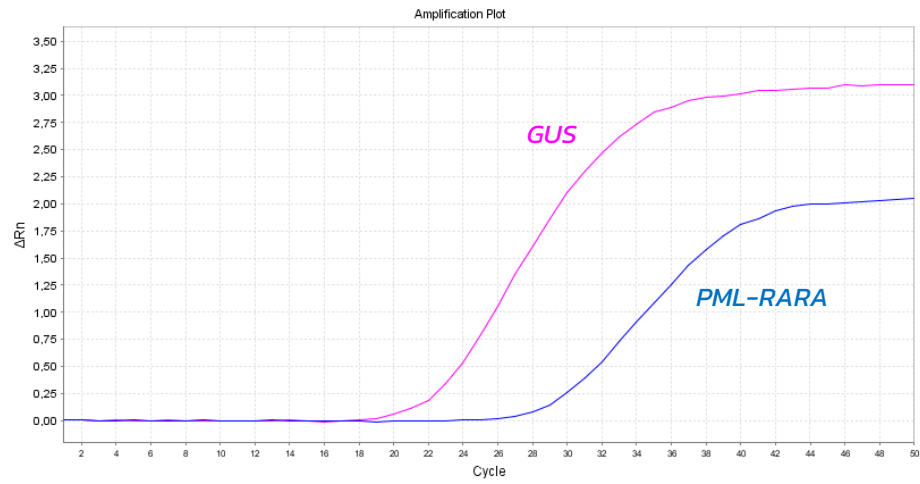


Figura 6. Resultado esperado en muestras de cDNA patogénicas. Ambos sistemas amplificarán sus dianas, tanto el gen GUS como el oncogén PML-RARA.

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.

Controles y muestras	PML-RARA	GUS	Causa
Control positivo	+	+	Resultado esperado
	-	-	Fallo de amplificación de la PCR ¹
Muestra a analizar	-	+	Resultado esperado
	+	+	
	-	-	Fallo en la configuración de la muestra ²
Control negativo de PCR	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con ADN humano o control positivo ³

Tabla 5. Interpretación de los posibles resultados del kit imagen® PML-RARA Screening

- (1) **Fallo de amplificación en la PCR:** Compruebe el programa de amplificación y la configuración de captura de la fluorescencia. Un fallo en la amplificación puede deberse a un problema técnico en la configuración del programa de PCR.
- (2) **Fallo de amplificación de la muestra:** Compruebe que la cuantificación de la muestra es la recomendada, si fuese así el resultado especificado puede deberse a que la muestra se encuentre altamente degradada.
- (3) **Contaminación de la PCR con ADN de humano o control positivo:** La contaminación de la PCR puede deberse a un manejo equivocado de la muestra, al uso de reactivos contaminados o a contaminación de origen ambiental. Limpie minuciosamente el laboratorio donde se ha preparado la PCR, así como los equipos y el material utilizados. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR. Prepare en último lugar la reacción de PCR que contiene el control positivo, con el fin de evitar la contaminación cruzada.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

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

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

En principio, 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® PML-RARA Screening ha sido validado con los reactivos incluidos en el kit y con 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)*,
Thermo Fisher Scientific)

Si usa utilizada una *master mix* de PCR diferente a la incluida en el kit, se recomienda realizar una validación con este nuevo reactivo. 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 dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.

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

