Instrucciones de uso

ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit

Ref. IMG-431

RUO

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.01

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.

Este producto está diseñado para su uso exclusivo para investigación (RUO, *Research Use Only)*. 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. ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit 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

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)		
Versión 01	ENE 2024	Creación del documento

índice

01 **Información general** 4

02 **Uso previsto** 5

03 **Características técnicas** 6

04 **Condiciones de recogida, manipulación y preparación de la muestra** 7

05 **Advertencias y precauciones de seguridad** 9

06 **Contenido y condiciones de almacenamiento del kit** 11

07 **Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran** 12

08 **Protocolo de ensayo** 14

08.1 | Preparación de los reactivos de PCR digital 14

08.2 | Preparación de las reacciones de amplificación 14

08.3 | Configuración del programa de PCR digital 15

09 **Análisis de los resultados** 17

10 **Troubleshooting** 20

11 **Limitaciones** 22

11.1 | Analíticas 22

11.2 | Equipos 22

11.3 | Reactivos 22

11.4 | Estabilidad del producto 23

12 **Características de rendimiento** 24

12.1 | Muestras de validación 24

12.2 | Límite de blanco (LOB) y límite de detección (LOD) 24

12.3 | Límite de cuantificación (LOQ) 24

12.4 | Especificidad analítica 25

12.5 | Repetibilidad y reproducibilidad 25

12.6 | Sensibilidad analítica 25

01 Información general

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación de células linfoides detenidas en una etapa temprana de diferenciación (linfoblastos), es decir, células inmaduras que no cumplen con su función. Además, el crecimiento descontrolado de linfoblastos desplaza a las células normales de la médula ósea, provocando una bajada de glóbulos rojos, plaquetas y linfocitos normales lo que se traduce en anemia, posibles sangrados e infecciones.

Se trata de una de las neoplasias hematológicas más comunes en niños, representado el 75% de los casos de leucemia infantil y constituye la causa más común de cáncer en edad pediátrica.

La alteración cromosómica más frecuente en la LMA es traslocación t(12;21)(p13;q21) que da lugar al gen de fusión *ETV6/RUNX1*. La fusión entre ambos genes ocurre entre los exones 5 y 6 de *ETV6* y el exón 2 de *RUNX1*, dando lugar al gen de fusión *ETV6-RUNX1* que codifica para una proteína quimérica con carácter oncogénico. Ambos genes codifican para factores de transcripción que, en condiciones normales, participan en el proceso de regulación de la hematopoyesis. La función alterada del producto de este gen de fusión da como resultado una inhibición activa de los promotores regulados por *RUNX1* haciendo que pase de ser un modulador a un represor transcripcional.

Esta alteración se produce en aproximadamente el 25% de las LLA infantiles diagnosticadas entre los 2 y los 10 años, y es indicador de una buena respuesta molecular al tratamiento. Sin embargo, también se asocia a un alto número de recaídas tardías que se asocian a menudo con resistencia a los tratamientos como los glucocorticoides.

Referencias

- *Mata-Rocha, Minerva et al. "Low Prevalence of ETV6::RUNX1 Fusion Gene in a Hispanic Population." Frontiers in pediatrics vol. 10 837656. 24 May. 2022, doi:10.3389/fped.2022.837656.*
- *Sun C, Chang L, Zhu X. Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. Oncotarget. 2017 May 23;8(21):35445-35459. doi: 10.18632/oncotarget.16367. PMID: 28418909; PMCID: PMC5471068.*
- *Bang, Benedicte et al. "A somatic UBA2 variant preceded ETV6-RUNX1 in the concordant BCP-ALL of monozygotic twins." Blood advances vol. 6,7 (2022): 2275-2289. doi:10.1182/bloodadvances.2021005703.*
- *Jin, Yanliang et al. "Determination of ETV6-RUNX1 genomic breakpoint by next-generation sequencing." Cancer medicine vol. 5,2 (2016): 337-51. doi:10.1002/cam4.579.*
- *Yoon JH, Lee S. Diagnostic and therapeutic advances in adults with acute lymphoblastic leukemia in the era of gene analysis and targeted immunotherapy. Korean J Intern Med. 2024 Jan;39(1):34-56. doi: 10.3904/kjim.2023.407. Epub 2024 Jan 1. PMID: 38225824; PMCID: PMC10790045.*
- *Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2020 Nov 1;105(11):2524-2539. doi: 10.3324/haematol.2020.247031. PMID: 33054110; PMCID: PMC7604619.*

02 Uso previsto

El kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit está dirigido a la detección y cuantificación de la fusión ETV6-RUNX1 a partir de muestras de ADN complementario (ADNc) de sangre periférica en pacientes diagnosticados o con sospecha de LLA positivos para t(8;21)(q22;q22.1).

El kit emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes en un ensayo multiplexado que permite la detección y cuantificación de la fusión *ETV6-RUNX1* frente a *ABL1* mediante la tecnología de PCR digital (dPCR).

El kit permite detectar las siguientes isoformas derivadas de la fusión *ETV6-RUNX1*:

- Exón 5 *ETV6* – Exón 2 *RUNX1*
- Exón 5 *ETV6* – Exón 3 *RUNX1*
- Exón 4 *ETV6* – Exón 3 *RUNX1*
- Exón 4 *ETV6* – Exón 2 *RUNX1*

Este kit no permite detectar reordenamientos *RUNX1-ETV6*.

ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit está indicado para uso exclusivo en investigación y está estrictamente dirigido a personal técnico de la salud y profesionales del sector de la biología molecular que necesiten identificar y cuantificar la fusión *ETV6-RUNX1*.

IMPORTANTE: La finalidad del kit no es la de determinar la suspensión del tratamiento o el seguimiento en un paciente tras la suspensión del tratamiento.

03 Características técnicas

El kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit está diseñado para el análisis de ADNc obtenido tras la retrotranscripción del ARN extraído de sangre periférica.

Para la validación del kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit se ha diseñado ADN sintético con la fusión *ETV6-RUNX1* junto con una región del gen de *ABL1* (endógeno). La detección y cuantificación de la fusión junto con el gen endógeno permite calcular la frecuencia de la fusión en la muestra. Además, se han analizado muestras positivas de ADNc de pacientes previamente genotipadas.

La validación completa permite establecer las siguientes **especificaciones técnicas**:

- **Tipo de muestra**: ADNc procedente de sangre periférica
- **Control positivo**: ADN sintético con la fusión ETV6-RUNX1 y una región como control endógeno de *ABL1*
- **Límite de detección**: 0.045% ± 0.01
- **Límite de cuantificación**: 0,1%
- **Número de reacciones por muestra**: 1
- **Número de dianas**: 2 (fusión ETV6-RUNX1 y región de *ABL1* como endógeno)
- **Duración del programa de dPCR**: 1 h 45 min.

El kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit es compatible con la plataforma *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System* (Thermo Fisher Scientific) con canales de fluorescencia FAM™ y VIC™. Este dispositivo incorpora el programa *QuantStudio Absolute Q Digital PCR Software CT* para llevar a cabo un análisis semiautomático de los resultados.

04 Condiciones de recogida, manipulación y preparación de la muestra

La toma, transporte, conservación y preparación de las muestras son pasos críticos para el rendimiento de los ensayos dirigidos a detectar y/o cuantificar transcritos de ARNm. Por ello, a continuación, destacamos algunos de los requisitos más importantes para el manejo de este tipo de muestras. La estabilidad de las muestras en condiciones de transporte y conservación distintas a las indicadas a continuación no se han evaluado con ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit.

- Toma de muestra y conservación.

  Para un mayor rendimiento, las muestras de sangre completa deben recogerse en tubos *PAXgene* indicados para purificar ARN intracelular a partir de sangre total siguiendo las directrices del fabricante. En caso de no proceder con la extracción de ARN inmediatamente tras la toma, se recomienda conservar las muestras a una temperatura de 4°C durante un máximo de 5 días sin separar el plasma de las células. Para almacenamientos de mayor duración, se recomienda congelar los especímenes entre -20°C y -70°C.

- Transporte de la muestra:

  Si la extracción de ARNm se realiza en un laboratorio diferente al de la toma de muestra, se recomienda realizar el envío dentro de los 5 días desde su toma, conservándola a 4°C y transportada en hielo seco.

- Extracción del ARN, condiciones de trabajo y conservación:

  Utilice un método de extracción de ARN humano adecuado, bien sea un método manual o automatizado. Dependiendo del método de extracción, el rendimiento y pureza del ARN extraído puede diferir. Como método de extracción automatizado, se ha utilizado con éxito el *Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit* (Promega, ref: AS1280) con el correspondiente *Maxwell® 16 Instrument* (Promega).

  Se recomienda limpiar a fondo las superficies y equipos con un producto específico para eliminar las RNAsas de la zona de trabajo previamente a la extracción, así como que todo el material fungible sea libre de RNAsas.

  El ARNm debe mantenerse a una temperatura de 4°C para un uso inmediato. Para corto y largo plazo, se recomienda mantener las muestras congeladas a -20°C y -80°C, respectivamente. No es aconsejable congelar y descongelar reiteradamente el ARN ya que puede afectar a su integridad.

- Retrotranscripción (RT-PCR) y conservación del ADNc:

  La retrotranscripción del ARNm a ADNc se ha llevado a cabo con el kit *SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) en una RT-PCR de dos pasos, a partir de 1.000 ng de ARNm. Cantidades de material de partida inferiores pueden afectar negativamente a la detección de transcritos de *ETV6-RUNX1* que estén poco representados en la sangre del paciente.

  El ADNc debe mantenerse a una temperatura de 4°C para su uso inmediato. Para corto y largo plazo, se recomienda mantener las muestras congeladas a -20°C y -80°C, respectivamente.

05 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.
- La contaminación con ARNasa/DNasa puede producir la degradación de las muestras de ARN y los productos ADNc. Utilice puntas de pipeta con filtro y tubos que no tengan nucleasa. Limpie bien todas las superficies de trabajo antes comenzar a trabajar.
- La eficacia diagnóstica de esta prueba sólo se ha establecido para sangre recogida en tubos *PAXgene*. No se ha evaluado el rendimiento de esta prueba con otros tipos de muestra o método de extracción.
- La fiabilidad de los resultados depende de la realización correcta de la recogida, el transporte, la conservación y el procesamiento de las muestras indicado en el apartado "04. Condiciones de recogida, manipulación y preparación de la muestra". Otras condiciones del manejo de las muestras pueden originar resultados incorrectos.
- Muestras con concentraciones de los transcritos diana inferiores al límite de detección establecido puede dar lugar a resultados erróneos.
- Prevención de riegos y buenas prácticas de laboratorio.
- 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 de materiales (MSDS) de un producto, se encuentra disponible a través de la página web https://healthincode.com/kits-de-analisis/
- 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.

06 Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

El kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit está compuesto por los siguientes reactivos:

- ***ETV6-RUNX1 Master Mix***, que contiene:
  - oligonucleótidos específicos.
  - sondas producidas por Applied Biosystems™ marcadas en FAM™ y VIC™ para la detección de la fusión *ETV6-RUNX1* y el gen *ABL1*, respectivamente.
  - agua libre de nucleasas.
- **Control positivo**: contiene ADN sintético con la fusión *ETV6-RUNX1* frente al gen *ABL1*.

Este kit contiene reactivos liofilizados para llevar a cabo 24 reacciones de PCR digital. En la Tabla 1 se indican las características físicas, cantidades y condiciones de conservación.

Tabla 1. Componentes del kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit.

Reactivos	Color del soporte	Cantidad	Conservación
ETV6-RUNX1 Master Mix	Disco negro	2 X 12 rxn	4°C
Control positivo	Tapón negro	6 rxn	4°C

07 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Micropipetas de 10 µL, 20 µL y 200 µL
- Vórtex
- Centrífuga
- *QuantStudio Absolute Q Digital PCR* (Thermo Fisher Scientific)

Reactivos:

- Agua libre de nucleasas
- Etanol absoluto
- *Absolute Q DNA Digital PCR Master Mix (5X)* (Ref. A52490)
- *Isolation Buffer* (Ref. A52730)
- *SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific)

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL y 200 µL)
- Tubos estériles de 1,5 mL
- Guantes de látex sin polvo
- *MAP16 Plate Kit* (Ref. A52865)

Kits complementarios

Para el análisis de las dianas relacionadas con el estudio de patologías hematológicas, Health in Code, S.L. también ofrece los siguientes kits de PCR a tiempo real:

- Imegen® BCR ABL1 Screening (ref. IMG-108)
- Imegen® m-BCR ABL (ref. IMG-121)
- Imegen® M-BCR ABL (ref. IMG-122)
- Imegen® Inv16 (ref. IMG-109)
- Imegen® PML-RARA Screening (ref. IMG-130)

- Imegen® PML-RARA (ref. IMG-111)
- Imegen® NPM1 (ref. IMG-235)
- Imegen® MPL (ref. IMG-236)

Mediante análisis de fragmentos:

- Imegen® FLT3 (ref. IMG-238)
- Imegen® CALR (ref. IMG-237)

Mediante análisis de PCR digital (dPCR):

- BCR-ABL1 Screening dPCR OncoKit (ref. IMG-424)
- FLT3-TKD2 dPCR OncoKit (ref. IMG-405)
- cKIT dPCR OncoKit (ref. IMG-407)
- mBCR-ABL dPCR Oncokit (ref. IMG-429)
- RUNX1-RUNX1T1 dPCR Oncokit (ref. IMG-430)
- NPM1 dPCR Oncokit (ref. IMG-432)
- MYD88 dPCR Oncokit (ref. IMG-434)

Mediante secuenciación masiva (NGS, *Next-Generation Sequencing*):

- Haematology OncoKitDx (ref. IMG-363)

08 Protocolo de ensayo

08.1 | Preparación de los reactivos de PCR digital

El primer paso antes de aplicar el protocolo será rehidratar los reactivos desecados:

- *ETV6-RUNX1 Master Mix*: añadir 20 µL de agua libre de nucleasas en cada vial.
- **Control positivo**: añadir 50 µL de agua libre de nucleasas en el vial.

NOTA: se recomienda conservar los reactivos rehidratados congelados a – 20°C.

08.2 | Preparación de las reacciones de amplificación

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo (punto 4 del protocolo).

En cada ensayo, se recomienda incluir el control positivo disponible en el kit y un control negativo de PCR para descartar contaminación de los reactivos.

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

01 Descongelar las muestras de ADNc.

NOTA:

> Tener en cuenta que es posible necesitar una dilución previa del ADNc, tal y como se indica en el apartado "10. Troubleshooting".

> Para muestras con calidades subóptimas, se aconseja centrifugar a 10.000 x g o a máxima velocidad disponible durante 1 minuto y coger la muestra de la parte superior del tubo.

02 Descongelar todos los reactivos del kit, el agua libre de nucleasas y la enzima *Absolute Q DNA Digital PCR Master Mix* (5X) (no incluida en el kit). Es importante equilibrar a temperatura ambiente antes de su uso.

NOTA: Mantener en hielo y proteger de la luz todos los reactivos cuando no estén en uso.

03 Agitar con vórtex 10 segundos todos los reactivos, incluyendo la enzima *Absolute Q DNA Digital PCR Master Mix* (5X).

04 Preparar el *mix* de PCR en un tubo de 1,5 mL con los reactivos indicados a continuación.

Reactivo	Volumen por reacción**
ETV6-RUNX1 Master Mix	1,5 µL
*Absolute Q DNA Digital PCR Master Mix (5x) **	2 µL

(*) Reactivo no suministrado por el fabricante (ver sección "07. Equipos, reactivos y materiales no suministrados").

(**) Ajustar el volumen final al número de reacciones como se indica al principio de la sección.

05 Mezclar el *mix* de PCR mediante vórtex de 10 segundos y spin de 30 segundos. Repartir 3,5 µL en diferentes tubos de PCR.

06 Transferir 6,5 µL del sobrenadante de las muestras a cada tubo de PCR con el *mix* de reacción preparado en el punto 4. Para el control negativo, añadir agua libre de nucleasas.

07 Mezclar el *mix* del punto 6 siguiendo una de las dos opciones indicadas a continuación:

- Pipeteando arriba y abajo entre 10 y 20 veces con cuidado de no generar burbujas.
- Vórtex entre 3-5 veces durante 1 segundo cada vez.

08 Centrifugar durante 1 min a 10.000 x g.

09 En un ángulo de 45°, cargar 9 µL del *mix* de PCR al fondo del pocillo de la placa *microfluidic array plate* MAP16 pipeteando hasta el primer tope de la pipeta.

10 A continuación, en un ángulo de 45°, cargar 15 µL del *Isolation Buffer* contra el lateral del pocillo dejándolo caer sobre los reactivos para evitar que se mezclen y formen burbujas.

Opcional: esperar 15 min antes de darle a *Start* manteniendo la placa dentro del equipo por si han formado burbujas o mezclado los reactivos durante la carga.

08.3 | Configuración del programa PCR a tiempo real

Carga de la *microfluidic array plate (MAP16)*

Ensamblar las tiras de la placa MAP17 en las 4 columnas de pocillos. Asegúrese de cubrir las columnas por completo y coloque las tapas de la placa MAP en todas las columnas, incluidas las columnas no utilizadas. Descargue la guía de usuario: *MAN0025621 QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System User Guide* disponible en su sitio web www.thermofisher.com, y siga las instrucciones del Capítulo 2.

Configuración del programa de PCR

Colocar la placa MAP en el *QuantStudio™ Absolute Q™ System*, modificar los canales óptimos y los parámetros de PCR según se especifica en la Tabla 2 y configurar el programa de dPCR indicado en la Tabla 3.

- Configuración del experimento:

Tabla 2. Configuración de los canales para la detección de los fluoroforos en el QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR System. QC: quality control.

Fluoróforo	Diana molecular	Análisis
FAM™	ETV6-RUNX1	Señal
VIC™	ABL1	Señal
ROX™	QC	QC

◇ Programa óptimo de PCR:

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para el QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR (Thermo Fisher Scientific).

Etapa	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	96°C	10 minutos
PCR Desnaturalización, anillamiento y extensión	40	96°C	5 segundos
		62°C	15 segundos

↘ Lectura de los *arrays* y obtención de resultados

Una vez completada la ejecución de la PCR, siga las instrucciones de la Guía del usuario del sistema de PCR digital *QuantStudio™ Absolute Q™* disponible en el sitio web www.thermofisher.com.

09 Análisis de los resultados

El enfoque utilizado en el diseño del kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit se basa en un ensayo multiplexado de dPCR no-competitivo en el que se detectan los transcritos de *ETV6-RUNX1* y un control endógeno, el gen *ABL1*, tal y como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Información de las dianas para cada sonda utilizada en el kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit

Fluoróforo	Función
FAM™	La sonda FAM™ identifica el transcrito *ETV6-RUNX1*
VIC™	La sonda VIC™ identifica el transcrito *ABL1*

El análisis de las muestras se realiza con el *software* específico del termociclador de PCR utilizado: *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR Software*. Para poder identificar si una muestra es positiva y cuantificarla, siga los pasos que se indican a continuación.

01 Vaya a la sección *"ANALYSIS"* para visualizar y seleccione una de las muestras.

02 En la parte inferior de la pantalla, elija el canal que quiere visualizar FAM™ para la fusión *ETV6-RUNX1* y VIC™ para el gen *ABL1*).

03 Seleccione la opción para visualizar los datos en un gráfico bidimensional (2D) o de nubes. Tras ajustar los ejes X e Y en los gráficos 2D, se pueden identificar hasta cuatro grupos o nubes (Figura 1):

- La nube de puntos negros representa las particiones donde no ha habido amplificación y, por tanto, no se ha registrado señal para ninguna sonda.
- La nube de puntos naranja corresponde a particiones únicamente positivas para la sonda VIC™ que hibrida en una región del gen *ABL1* para el control endógeno.
- La nube de puntos morada corresponde a particiones únicamente positivas para la sonda FAM™ que hibrida con el transcrito *ETV6-RUNX1*.
- La nube de puntos verde, o grupo combinado, corresponde a particiones positivas en las que se ha registrado señal para el transcrito mutado y el gen *ABL1*.

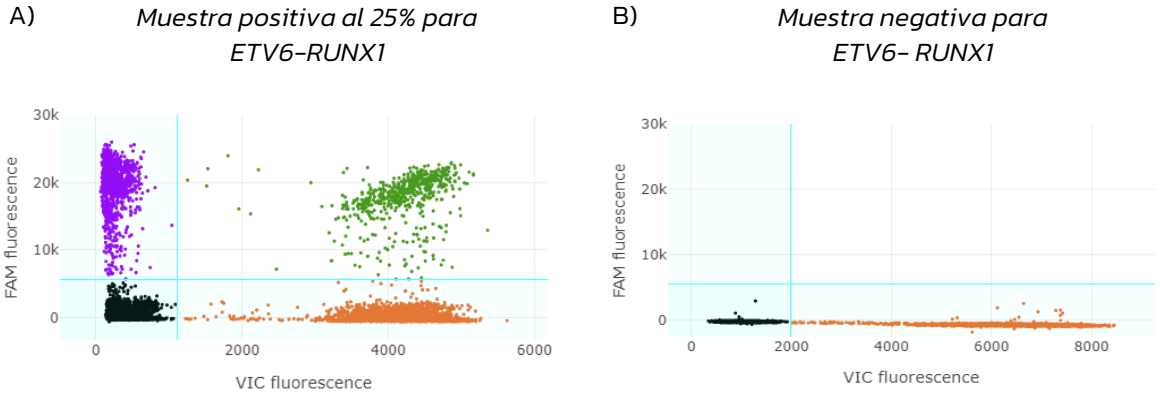

Figura 1. Gráficos bidimensionales (2D) para la cuantificación de los transcritos ETV6-RUNX1 frente a ABL1 con el ensayo ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit. ***A)*** *Muestra positiva al 25% para ETV6-RUNX1. El gráfico observado se obtiene al seleccionar el canal de fluorescencia específico para el transcrito ETV6-RUNX1 (FAM™) frente a ABL (VIC™).* ***B)*** *Muestra negativa para ETV6-RUNX1. No se observa amplificación específica para los transcritos ETV6-RUNX1. En todos los casos, la nube de puntos negra representa particiones donde no se ha producido amplificación.*

La Tabla 5 resume la interpretación de los posibles resultados para el kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit.

*Tabla 5. Posibles resultados al cargar una muestra de ADNc, siendo + y – la presencia o ausencia de nubes o clusters. *Los canales combinados corresponden a las nubes verdes, donde se amplifica el transcrito mutado junto el ABL1.*

Interpretación de resultados			
Muestra	Canal FAM™	Canal VIC™	Canales Combinados *
ETV6-RUNX1 positiva	+	+	+
ETV6-RUNX1 negativa	–	+	–

Cálculo de la frecuencia de la fusión ETV6-RUNX1 en la muestra

A partir de los gráficos obtenidos, el software de análisis informa los resultados en copias por microlitro (copias/µL) en base a la concentración de las dianas que contiene la reacción de dPCR. Con estos datos, se procede a la cuantificación de los transcritos ETV6-RUNX1 detectados expresada como una medida relativa frente al gen *wild-type*, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%\ ETV6-RUNX1 = \frac{ETV6-RUNX1\ cp/\mu L}{ABL1\ cp/\mu L}\ x\ 100$$

Donde:

- **ETV6-RUNX1**: son las copias/µL en FAM™ reportadas por el programa de análisis.
- **ABL1**: son las copias/µL para VIC™ reportadas por el programa de análisis.

Para que el ensayo pueda considerarse válido, el usuario debe asegurarse de que se cumplen las siguientes condiciones:

- No hay señal de amplificación del control negativo de PCR en ninguno de los canales configurados.
- Hay señal en todos los canales (FAM™ y VIC™) en la reacción con el control positivo.
- Para alcanzar la sensibilidad mínima del kit (LOD 0,045%), es necesario obtener al menos 1.100 copias/µL de *ABL1*.

En muestras con concentración elevada de trascritos de *ETV6-RUNX1* o *ABL1*, el ensayo con el ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit puede generar resultados NO VÁLIDOS.

Esta condición, puede afectar simultáneamente a:

- **La separación de las nubes.** Las nubes combinadas (verdes), donde ha habido amplificación de la diana y el endógeno, muestran una lluvia pronunciada, dificultando la separación con el resto de las nubes.
- **Las concentraciones del transcrito de *ABL1*.** Concentraciones de *ABL1* >10.000 copias/µL (>90.000 copias totales) pueden saturar el sistema. Se recomienda que las concentraciones de *ABL1* se mantengan en rangos de 1.500 – 2.500 copias/µL para obtener una buena separación de las nubes y una correcta cuantificación.

En el caso de obtener otros resultados diferentes a los expuestos en este apartado, consultar la sección "10. Troubleshooting" de este manual.

10 Troubleshooting

En la Tabla 6 se presenta resultados esperados en un ensayo de ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit que podrían obtenerse para los controles y muestras en un ensayo, así como combinaciones NO VÁLIDAS, sus posibles causas y soluciones.

Tabla 6. Posibles resultados del ensayo. Se incluyen resultados no válidos, sus causas y solución.

Control	Resultado		Causa
	FAM™	VIC™	
Control positivo	+	+	Resultado esperado
	–	–	Fallo de amplificación de la PCR [1]
Muestra	–	+	Resultado esperado
	+	+	
	+	+	Nubes solapadas [2]
	+	–	Resultado no válido [3]
	–	–	Fallo de amplificación de la PCR [1] Fallo en la amplificación de la muestra [4]
Control negative de PCR	–	–	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con ADN humano [5]
	+	–	
	–	+	

(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 o a un error en preparación de los mixes de reacción.

(2) Saturación por carga de cDNA: muestras con elevadas concentraciones de transcritos de ETV6-RUNX1 o ABL1 pueden producir señal en los canales correspondientes, pero con mucha lluvia. En estos casos, se recomienda diluir la muestra para obtener una concentración de ABL1 de 1500-2500 copias/µL.

(3) Resultado no válido: no hay amplificación de VIC™ (control endógeno *ABL1*). Se recomienda repetir el ensayo.

(4) Fallo en la amplificación de la muestra: la calidad de la muestra afecta directamente a la PCR. En caso de que la muestra esté altamente degradada, podría darse ausencia de amplificación. Por otro lado, si la RT-PCR se realiza con cantidades superiores de ARN a las recomendadas, el fallo de amplificación puede deberse a saturación por exceso de ADNc. En ese caso se recomienda diluir la muestra 1/10. En caso de que las nubes no

hayan sido distribuidas satisfactoriamente como se muestra en las Figuras 1 y 2 del apartado "09. Análisis de resultados", se debe hacer un reajuste hasta obtener concentraciones de 1500-2500 copias/µL en función de la concentración obtenida.

(5) Contaminación de la PCR con ADN humano: 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. En este caso se recomienda repetir el ensayo.

11 Limitaciones

11.1 | Analíticas

El kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit está diseñado para detectar y cuantificar los transcritos de la fusión *ETV6-RUNX1* descritos en el apartado "02. Uso previsto". No se ha evaluado la capacidad para detectar otros transcritos de fusión raros derivados de t(12;21).

Cantidades de partida de ARNm inferiores a la indicada durante la retrotranscripción (apartado "04. Condiciones de recogida, manipulación y preparación de la muestra"), pueden afectar negativamente a la detección de transcritos de *ETV6-RUNX1* presentes en muy baja frecuencia en la sangre del paciente.

En muestras con una elevada concentración de *ETV6-RUNX1* o *ABL1*, el ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit puede generar resultados NO VÁLIDOS debido a la saturación del sistema. En este caso, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra. Consulte la Tabla 6 en el apartado "10. Troubleshooting" para obtener más información.

Pacientes con niveles muy bajos de transcrito *ETV6-RUNX1* (es decir, por debajo del LOD 0,045%) podrían detectarse en el ensayo. Sin embargo, la precisión del ensayo no se garantiza por debajo del límite de detección establecido.

Para alcanzar la sensibilidad especificada con una correcta precisión, es necesario obtener al menos 1.100 copias/µL de *ABL1*.

11.2 | Equipos

ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit ha sido validado usando la plataforma de amplificación:

- *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System* (Thermo Fisher Scientific)

11.3 | Reactivos

ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 7 de este manual (Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran).

Este kit está validado con sangre recogida en tubos *PAXgene*. Las modificaciones de estos procedimientos pueden afectar al rendimiento de la prueba.

Este producto está validado con el kit *SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific). Las modificaciones de estos procedimientos pueden afectar al rendimiento de la prueba.

11.4 | 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.

12 Características de rendimiento

12.1 | Muestras de validación

El kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit está diseñado para el análisis de ADNc total extraído a partir de muestras de sangre periférica.

Para la validación analítica del kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit se ha diseñado ADN sintético que contiene la fusión *ETV6-RUNX1* y la región de *ABL1* utilizada como control endógeno.

Asimismo, el kit ha sido validado con 29 muestras clínicas positivas y 15 muestras negativas para determinar la sensibilidad y especificidad del kit.

12.2 | Límite de blanco (LOB) y detección (LOD)

Los parámetros de límite de blanco (LOB) y límite de detección (LOD) del kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit se determinaron utilizando el dispositivo *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System*.

Para el cálculo del LOB, se utilizaron 15 muestras negativas. En todos los casos se obtuvo el resultado negativo esperado permitiendo establecer un LOB al 95% de intervalo de confianza (IC) de 0,015%. Teniendo en cuenta el LOB obtenido, se evaluó el LOD en 10 réplicas de las mezclas correspondientes de ADN sintético para obtener una frecuencia alélica del 0,01% del transcrito *ETV6-RUNX1*. Los resultados obtenidos permitieron establecer un LOD al 0,045% ± 0,01 con un IC del 95%.

12.3 | Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación (LOQ) del kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit se estimó realizando 10 réplicas con ADN de sintético diluidas hasta alcanzar una frecuencia alélica del 0,1%. Los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación para establecer el LOQ al 0,1% (CV < 25%).

12.4 | Especificidad analítica

La especificidad analítica del kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit se determinó analizando 15 muestras negativas para la fusión *ETV6-RUNX1*. Esta prueba, no detectó ninguna señal de *ETV6-RUNX1* por encima del LOD establecido en ninguna de las muestras utilizadas.

12.5 | Reproducibilidad y repetibilidad

Los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad del kit ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit se han evaluado con muestras de ADN sintético con la fusión *ETV6-RUNX1* al LOQ establecido (0,1%).

Para determinar a la repetibilidad del ensayo, se cargaron 10 réplicas del ADN sintético con la fusión *ETV6-RUNX1* al 0,1%, obteniendo una cuantificación media de 0,09% ± 0,02 (DS) y un coeficiente de variación del 18,30%.

Para la reproducibilidad, se analizaron 2 réplicas por ensayo en tres días diferentes (30 medidas totales) en el siguiente rango de concentraciones 0.05%, 0.1%, 0,5% y 5% para la fusión *ETV6-RUNX1*. El coeficiente variación no superó en ningún caso el 25% mostrando una excelente precisión para el ensayo de ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit.

12.6 | Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica del ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit se analizaron 29 muestras clínicas positivas para ETV6-RUNX1 evaluadas mediante qPCR en los hospitales de procedencia. El ensayo ETV6-RUNX1 dPCR OncoKit detectó todas las muestras como positivas, estableciendo así una sensibilidad del 100%.

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