



imegen



# Instrucciones de uso

## Imegen<sup>®</sup> NPM1

**REF** **IMG-235**

Fabricado por:  
Instituto de Medicina Genómica SL  
Agustín Escardino 9,  
Parc Científic de la Universitat de València  
46980 Paterna (Valencia, España)  
+34 963 212 340 - info@imegen.es

[imegen.es](http://imegen.es)

Rev. 3. 17/01/2020



AEMPS (Nº 2019 09 0061 EN)



Página 1 de 16



# imegen

Imegen 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 diagnóstico *in vitro*.** Imegen 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 Imegen, 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. Imegen 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 Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit **Imegen® NPM1** 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:

**Teléfono:** 963 212 340

**e-Mail:** [tech.support@imegen.es](mailto:tech.support@imegen.es)

**imegen®** es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España

| <b>Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)</b> |   |
|---|---|
| Versión 02  | Cambio introducido: Adaptación a los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i> . |
| Versión 03  | Cambio introducido: Corrección apartado 1.  |



# imegen

## Índice

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Información general</b>                                   | 4  |
| <b>2. Uso previsto</b>  | 5  |
| <b>3. Características técnicas</b>                              | 6  |
| <b>4. Advertencias y precauciones de seguridad</b>              | 7  |
| <b>5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit</b>     | 8  |
| <b>6. Equipos y materiales necesarios que no se suministran</b> | 9  |
| <b>7. Protocolo de ensayo</b>                                   | 10 |
| 7.1 Preparación de las reacciones de amplificación              | 10 |
| 7.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real             | 10 |
| <b>8. Análisis de los resultados</b>                            | 12 |
| <b>9. Troubleshooting</b>                                       | 15 |
| <b>10. Limitaciones</b>   | 16 |
| 10.1 Equipos  | 16 |
| 10.2 Reactivos  | 16 |
| 10.3 Estabilidad del producto                                   | 16 |



## 1. Información general

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica maligna de la línea mieloide, caracterizada por la rápida proliferación de células inmaduras que se acumulan en la médula ósea.

Entre los diversos eventos mutacionales involucrados en la patogénesis de este cáncer, las mutaciones del gen *NPM1*, codificante de la proteína nucleofosmina, afectan a alrededor de un 30% de los pacientes de AML, teniendo lugar preferentemente en aquellos tumores sin alteraciones cariotípicas. El gen *NPM1*, localizado en 5q35.1, codifica la proteína NPM1, localizada en el nucléolo, e implicada en múltiples funciones incluyendo la regulación de la vía de supresión tumoral ARF-p53, la duplicación de los centrosomas y la biogénesis y transporte de los ribosomas, entre otras. Las mutaciones de *NPM1* (NM\_002520.6) tienen lugar mayoritariamente en el exón 11 en forma de un inserto de 4 nucleótidos que altera la pauta de lectura, siendo los tipos A, B y D las mutaciones más frecuentes.

En la clasificación actualizada de la OMS, las LMAs con nucleofosmina mutada (también conocida como NPMc+) constituyen una entidad clínico-patológica y molecular con implicaciones clínicas, de estratificación del riesgo, pronósticas y terapéuticas. Así, la OMS establece el estudio simultáneo del gen *FLT3* dado que mutaciones en el gen *NPM1* están asociadas a un mejor pronóstico cuando no suceden junto con otras alteraciones como las FLT3-ITDs.

### Referencias

- Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of *NPM1* mutations in AML. *Leukemia*. 2017;31: 798–807.
- Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107: 4011–4020.
- McClure RF, Ewalt MD, Crow J, Temple-Smolkin RL, Pullambhatla M, Sargent R, et al. Clinical Significance of DNA Variants in Chronic Myeloid Neoplasms. *J Mol Diagnostics*. 2018;20: 717–737.



**imegen**

## 2. Uso previsto

El kit **Imegen-NPM1** está dirigido al diagnóstico de mutaciones en el gen *NPM1* mediante un ensayo cualitativo de PCR a tiempo real que permite amplificar simultáneamente las mutaciones A, B y D, situadas en el exón 11 (NM\_002520.6).

|                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| <i>Wild-type</i> | TATTCAAGATCTCTG----GCAGTGGAGGAAGTC  |
| Variante A       | TATTCAAGATCTCTCTCTGGCAGTGGAGGAAGTC  |
| Variante B       | TATTCAAGATCTCTGCAATGGCAGTGGAGGAAGTC |
| Variante D       | TATTCAAGATCTCTGCCTGGCAGTGGAGGAAGTC  |

Este ensayo emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes en un análisis validado para detectar la presencia de mutaciones en el gen *NPM1* al mismo tiempo que del gen endógeno, *β-globina*, en una muestra de ADN genómico. El estudio de *β-globina* actúa como control positivo interno de la muestra de ADN incluida en el ensayo.

Los resultados obtenidos en este ensayo permiten confirmar el diagnóstico del paciente. Este ensayo no es óptimo para el estudio de enfermedad mínima residual (EMR) en pacientes de AML.

**Imegen-NPM1** es para uso en diagnóstico *in vitro* y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.



imegen

### 3. Características técnicas

El kit **Imegen-NPM1** ha sido validado utilizando material de referencia obtenido del biobanco INCLIVA. Además, se han incluido en la validación muestras de pacientes diagnosticados, proporcionadas por el Hospital Regional Universitario Carlos Haya (Málaga, España) y material interno de la Unidad de Genética Médica de imegen, así como vectores sintéticos certificados (GenScript) que contienen las secuencias de interés. Este vector se proporciona como control positivo, para verificar el funcionamiento correcto del sistema de PCR. La validación completa proporciona un método de diagnóstico robusto y específico.

La sensibilidad y especificidad del sistema de detección de *NPM1* se ha confirmado mediante estudios *in silico* y empíricamente incluyendo muestras wild-type and muestras mutantes previamente genotipadas utilizando otra tecnología. El límite de detección (LOD) del sistema se ha establecido en un 10%.

El tipo de material necesario para este estudio es ADN genómico procedente de sangre periférica. La cantidad total de ADN necesario para la realización del ensayo es de 50 ng.

Imegen está certificada frente a la norma **UNE-EN ISO 13485:2018 Productos Sanitarios: Sistemas de Gestión de Calidad – Requisitos para fines reglamentarios** por la AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS para el Diseño, desarrollo y producción de productos sanitarios para diagnóstico in vitro:

- Kits de análisis genético
- Software para análisis bioinformático de datos genéticos



**imegen**

## 4. Advertencias y precauciones

1. Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
2. No pipetear con la boca.
3. No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
4. Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
5. 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.
6. 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.
7. Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
8. 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.
9. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
10. 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.
11. El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por imegen.
12. El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por imegen, por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.



**imegen**

## 5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

El kit contiene los siguientes reactivos necesarios para llevar a cabo las reacciones de PCR, repartidos en los siguientes componentes:

- **NPM1 Master Mix:** contiene los oligonucleótidos y sondas, para amplificación por PCR. Una sonda marcada con el fluorocromo FAM™ para la detección específica del producto de amplificación de las formas A, B y D de *NPM1*. Una sonda marcada con el fluorocromo VIC™ para la detección específica del producto de amplificación del gen  $\beta$ -globina.
- **General Master Mix:** mezcla de DNA polimerasa termoestable, dNTPs y resto de reactivos necesarios para la PCR.
- **Positive Control:** control positivo que contiene la secuencia para la amplificación de la mutación tipo A de *NPM1*.

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 24 determinaciones.

| Reactivos          | Color          | Cantidad    | Conservación |
|--------------------|----------------|-------------|--------------|
| Master Mix NPM1    | Disco amarillo | 180 $\mu$ l | -20°C        |
| General Master Mix | Disco blanco   | 300 $\mu$ l | 4°C          |
| Positive Control   | Tapa marrón    | 25 $\mu$ l  | -20°C        |

Tabla 1. Componentes del kit imegen-NPM1





## 6. Equipos y materiales necesarios que no se suministran

### Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real (canales FAM y VIC)
- Micropipetas de 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L y 200  $\mu$ L
- Vortex
- Centrífuga

### Materiales:

- Placas de 96 pocillos ópticas o tubos ópticos de 0.2 mL
- Material fungible óptico compatible con el termociclador de PCR a tiempo real
- Puntas de pipetas con filtro (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L y 200  $\mu$ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Guantes de látex

### 6.1 Kits complementarios

Para el diagnóstico de neoplasias hematopoyéticas, imegen también ofrece los siguientes ensayos de PCR a tiempo real:

- IMG-236 imegen-MPL**
- IMG-108 imegen-BCR-ABL1 Screening**
- IMG-109 imegen-Inv16**
- IMG-121 imegen-M-BCR-ABL1**
- IMG-122 imegen-m-BCR-ABL1**
- IMG-111 imegen-PML-RARA**
- IMG-130 imegen-PML-RARA Screening**

Para el diagnóstico de neoplasias hematopoyéticas, imegen también ofrece los siguientes ensayos de análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar:

- IMG-237 imegen-CARL**
- IMG-238 imegen-FLT3**



## 7. Protocolo de ensayo

### 7.1 Preparación de las reacciones de amplificación

1. Descongelar todos los reactivos del kit y el ADN de las muestras.
2. Agitar cada uno de los reactivos en vortex y mantener en frío.
3. En un tubo de 1.5 mL preparar el mix de PCR añadiendo los siguientes reactivos:

| <b>Reactivos</b>   | <b>Cantidad por reacción</b> |
|--------------------|------------------------------|
| NPM1 Master Mix    | 7.5 $\mu$ L                  |
| General Master Mix | 12.5 $\mu$ L                 |

Nota: 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.

4. Agitar en vortex y dar spin al mix de PCR y dispensar 20  $\mu$ L en los correspondientes pocillos del material fungible óptico.
5. Una vez dispensado el mix de PCR añadir a los pocillos correspondientes:
  - 5  $\mu$ L de las muestras de ADN genómico (10 ng/ $\mu$ L)
  - 5  $\mu$ L del control positivo
  - 5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (control negativo de PCR)

Nota: Se recomienda añadir un control negativo de PCR para descartar la contaminación de los reactivos, y también un control positivo para asegurar el correcto funcionamiento de la reacción de PCR.

6. 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.

### 7.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real

- Tipo de experimento: Quantitation-Standard Curve
- Velocidad de rampa: Standard
- Volumen de reacción: 25  $\mu$ L
- Referencia basal ROX™: incluida



**imegen**

- Fluoróforos de las sondas TaqMan®:

| Sonda       | Emisor | Genotipado          | Quencher |
|-------------|--------|---------------------|----------|
| NPM1-P      | FAM™   | Alelos NPM1-A,B y D | MGB      |
| B-Globina-P | VIC™   | <i>B-Globina</i>    | MGB      |

Tabla 2. Información de las sondas de hidrólisis

- Programa óptimo:

| Campos       | Etapa 1               | Etapa 2           |  |
|--------------|-----------------------|-------------------|--|
|              | Activación enzimática | PCR               |  |
| Nº de Ciclos | 1 ciclo inicial       | 40 ciclos         |  |
|              |                       | Desnaturalización | Unión de oligonucleótido/<br>Extensión |
| Temperatura  | 95°C                  | 95°C              | 60°C                                   |
| Tiempo       | 10 minutos            | 15 segundos       | 1 minuto*                              |

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para el CFX96 (Bio-Rad), 7500 FAST o StepOne Plus (Applied Biosystem)

\*Detección de la fluorescencia

## 8. Análisis de resultados

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

- Comprobar que en el control negativo de PCR no hay amplificación, ni en el canal FAM ni en el canal VIC. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el ensayo para descartar que se haya producido una contaminación accidental.
- Comprobar que en el control positivo hay amplificación tan sólo del *NPM1*, formas A,B y D (canal del fluorocromo FAM). No habrá amplificación de  $\beta$ -globina (canal VIC) en el control positivo.
- Comprobar que en todas las muestras analizadas existe amplificación del gen  $\beta$ -globina (VIC). La no amplificación de la  $\beta$ -globina será un indicador de baja calidad del DNA en la muestra e invalidará la obtención de ninguna conclusión.
- Para analizar las muestras hay que emplear un *software* específico. Si se realiza un análisis manual según el incremento de fluorescencia en cada uno de los canales se debe tener en cuenta las siguientes observaciones:

A continuación se muestran los posibles resultados obtenidos con el kit **imegen-NPM1**:

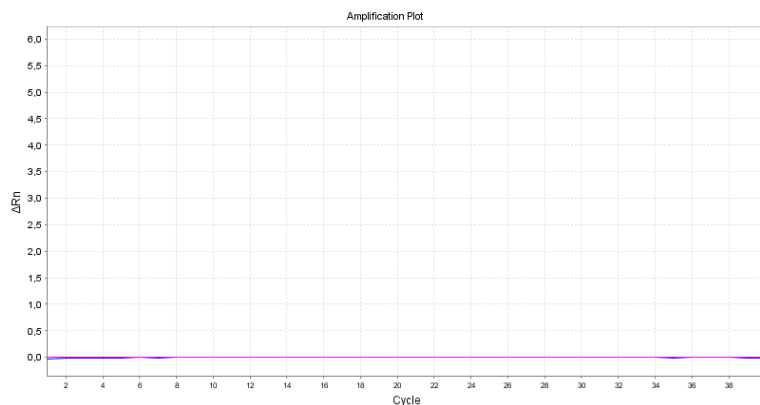


Figura 1. Resultado esperado en el control negativo de PCR. No se observa señal de amplificación en ningún canal de fluorescencia.

### MUESTRAS DE gDNA

- Comprobar que en todas las muestras se detecta el gen de referencia

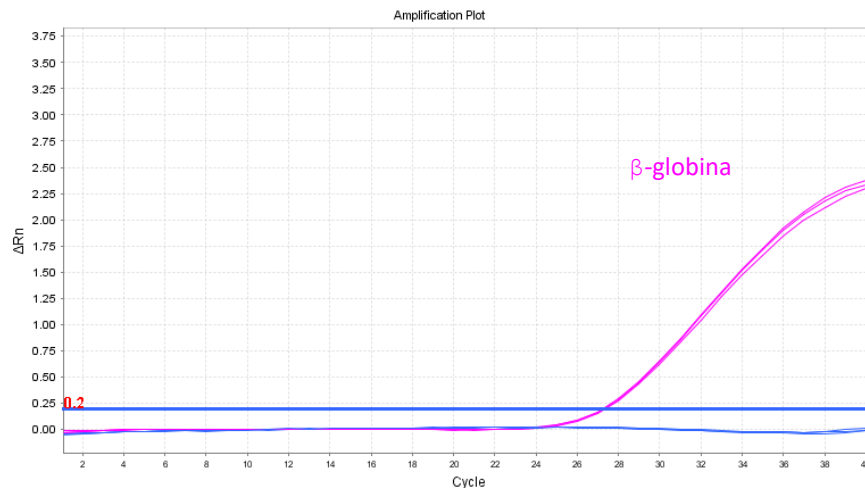


Figura 2. Muestra de ADN sin *NPM1* mutado (o formas mutadas distintas a las A, B, o D): se observará amplificación sólo en el canal VIC (B-globina, se muestra en rosa).

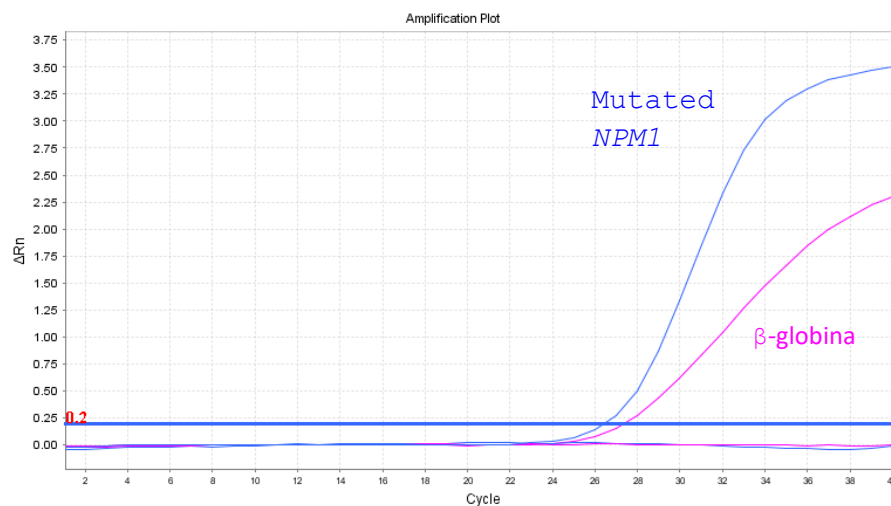


Figura 3. Resultado esperado a partir de una muestra con el gen *NPM1* mutado (formas A, B, o D). Se observará amplificación en ambos canales (en este gráfico β-globina se muestra en rosa, y *NPM1*-A,B,D se muestra en azul).



# imegen

## CONTROL POSITIVO NPM1

- Comprobar que se detecta el gen *NPM1* mutado.

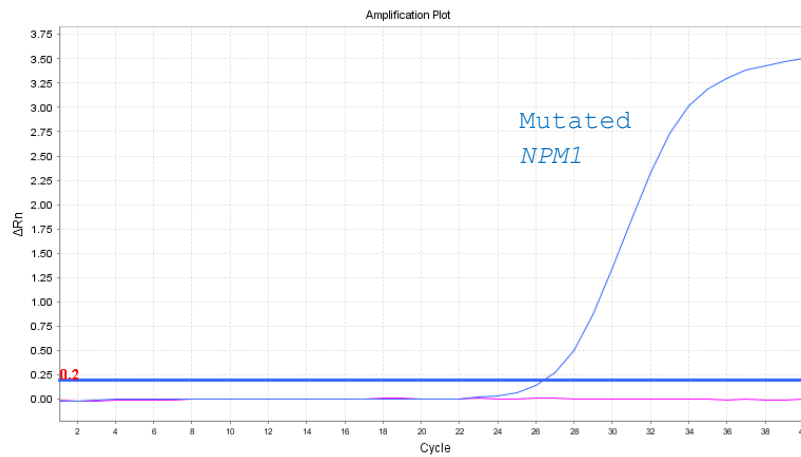


Figura 4. Resultado esperado a partir del control positivo. Se detecta amplificación para *NPM1* mutado. La amplificación de *NPM1*-tipo A se muestra en azul.



## 9. Troubleshooting

La siguiente tabla representa los resultados que podrían obtenerse usando los controles positivos (Control NPM1), negativos y las muestras de ADN genómico. 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                | NPM1 | B-globina | Resultado / Interpretación  |
|------------------------|------|-----------|---|
| Control NPM1           | +    | -         | Resultado esperado  |
|                        | -    | -         | Fallo en la configuración de la PCR <sup>1</sup>                    |
| Muestra ADN            | -    | +         | Resultado esperado  |
|                        | +    | +         |   |
|                        | -    | -         | Fallo de amplificación de las muestras de ADN <sup>2</sup>          |
| Control Negativo (NTC) | -    | -         | Resultado esperado  |
|                        | +    | +         | Contaminación con ADN humano o con el control positivo <sup>3</sup> |

Tabla 5. Interpretación de los posibles resultados obtenidos utilizando imegen-NPM1

<sup>1</sup> **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 son correctos.

<sup>2</sup> **Fallo de amplificación de la muestra de ADN:** Un fallo de amplificación del gen endógeno en la muestra de ADN podría sugerir que la cantidad o la calidad de la muestra de ADN está comprometida. En esta situación, se recomendaría un segundo análisis o extracción ADN antes de realizar un segundo ensayo e interpretación de los resultados.

<sup>3</sup> **Contaminación con ADN humano o con el control positivo (Control NPM1):** 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.



# imegen

## 10. Limitaciones

### 10.1 Equipos

**imegen-NPM1** ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- 7500 FAST Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
- StepOne Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
- CFX96 Real-Time PCR System (BioRad)

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

### 10.2 Reactivos

**imegen-NPM1** se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual (Equipos y materiales necesarios que no se suministran).

### 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.