imegen

Bringing genomics to health

CE IVD

Instrucciones de uso

imegen® m-BCR-ABL

Cuantificación del reordenamiento m-BCR: BCR-ABL p190 mediante PCR a tiempo real

REF **IMG-122**

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

ISO 13485
BUREAU VERITAS Certification
Nº ES069949-1

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 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® m-BCR-ABL*** 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

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

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)	
Versión 03	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 in vitro.

imegen

Índice

1. **Información general** 4
2. **Uso previsto** 5
3. **Características técnicas** 5
4. **Advertencias y precauciones de seguridad** 7
5. **Contenido y condiciones de almacenamiento del kit** 8
6. **Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran** 9
7. **Protocolo de ensayo** 10
   - 7.1 Preparación de los reactivos 10
   - 7.2 Preparación de las curvas patrón 10
   - 7.3 Preparación de las reacciones de amplificación 11
   - 7.4 Configuración del programa de PCR 12
8. **Análisis de los resultados** 14
9. **Troubleshooting** 15
10. **Limitaciones** 16
    - 10.1 Equipos 16
    - 10.2 Reactivos 16
    - 10.3 Estabilidad del producto 16

1. Información general

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

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 anormal da lugar a una actividad tirosina quinasa aumentada que produce el crecimiento anormal y fuera de control de linfocitos, dando lugar a la leucemia.

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

- 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

2. Uso previsto

El kit **imegen m-BCR-ABL1** emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis para la amplificación y cuantificación del reordenamiento *Minor*, m-BCR:BCR-ABL1 (p190) mediante PCR a tiempo real. Este kit le permite calcular el número de copias del reordenamiento y el número de copias del gen endógeno ABL, comparándolo con un único plásmido que posee una copia de las dos dianas de amplificación. Además, este análisis genético permite al usuario detectar enfermedad mínima residual (EMR). El nivel de sensibilidad que se puede alcanzar depende del número máximo de copias del gen de referencia (ABL1) que se pueda detectar.

Para alcanzar el límite de sensibilidad necesario para un análisis de enfermedad mínima residual con una respuesta molecular clínicamente significativa, es importante optimizar el proceso de extracción de ARN total de células de sangre periférica o de médula ósea y, por tanto, los protocolos de transcripción reversa para maximizar la cantidad de ADN complementario (cDNA) presente en cada muestra.

imegen 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.

Imegen m-BRC-ABL1 es sólo para uso diagnóstico *in vitro* y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

3. Características técnicas

El kit **imegen m-BCR-ABL1** ha sido validado utilizando muestras de cDNA sintetizado a partir de la retrotranscripción de ARN total, extraído de muestras de sangre periférica de pacientes sanos y de pacientes diagnosticados con leucemia mieloide crónica. Este kit detecta específicamente los productos de fusión y el gen de referencia (ABL1) mencionado en el apartado 2 de este manual (finalidad del producto).

La validación del kit imegen m-BCR-ABL1 ha sido llevada a cabo utilizando los siguientes reactivos no incluidos en este kit:

- M-MLV RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase).
  Retrotranscripción de 1 µg de ARN total
- TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 (ThermoFisher Scientific).

El límite de detección (LOD) de este análisis ha sido establecido en 5 copias totales de ABL1 y m-BCR-ABL1 (p190), empleando nuestro estándar de ADN sintético, plásmido pIMEGEN, calibrado con el material de referencia certificado del IRMM (ERM®-AD623).

El límite de cuantificación (LOQ) es el valor mínimo cuantificable, establecido en 50 copias totales, de ahí que el punto más diluido incluido en la curva estándar corresponda con el LOQ tanto para el gen de referencia ABL1 como para el reordenamiento m-BCR. Este kit es adecuado para detectar una respuesta molecular (MR) correspondiente a una reducción de 4 log del Estudio Aleatorizado Internacional, definido como:

(i) Enfermedad detectable ≤ 0.01% BCR-ABL1

(ii) Enfermedad indetectable en cDNA con ≥ 10,000 copias del gen de referencia ABL1

Este producto cumple con los requisitos de calidad establecidos por la ISO 13485, tanto en su proceso de validación y fabricación como en los materiales utilizados.

4. Advertencias y precauciones de seguridad

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.

5. 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:

- m-BCR Master-Mix: Oligonucleótidos y sonda de hidrólisis (FAM™) específicos para amplificar el reordenamiento m-BCR-ABL.
- ABL Master-Mix: Oligonucleótidos y sonda de hidrólisis (FAM™) específicos que permite detectar la presencia del gen de referencia ABL1.
- BCR-ABL Control: Un control positivo de la translocación m-BCR-ABL.

Reactivos	Color	Viales	Conservación
m-BCR Master-Mix	Disco morado	2 x 24 reacciones	4ºC
ABL Master-Mix	Disco amarillo	2 x 24 reacciones	4ºC
BCR-ABL Control	Tapa morada	4 viales	4ºC

Tabla 1. Componentes del kit imegen m-BCR-ABL

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

6. Equipos, reactivos y materiales no suministrados

Equipos:

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

Reactivos:

- 2x PCR Master Mix (HotStart DNA Polymerase)
- Agua libre de nucleasas

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

Materiales:

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

6.1 Kits complementarios

imegen proporciona una kit de screening mediante PCR en tiempo real que permite al usuario detectar la presencia de los oncogenes BCR-ABL1 más frecuentes, incluidos M-BCR-ABL1 (p210) y m-BCR-ABL1 (p190). Si los resultados de cribado obtenidos para el reordenamiento BCR-ABL1 son positivos, se recomienda realizar la cuantificación de M-BCR-ABL1 y m-BCR-ABL1.

IMG-108 imegen-BCR-ABL1 Screening
IMG-121 imegen-M-BCR-ABL1

7. Protocolo de ensayo

7.1 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 4ºC durante una hora antes de su uso.

Reactivos	Rehidratación
m-BCR Master Mix	130 µL de agua/vial
ABL1 Master Mix	130 µL de agua/vial
BCR-ABL Control	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 su rehidratación, recomendamos conservarlos a -20ºC.

7.2 Preparación de las curvas patrón

El protocolo para la preparación de las reacciones de amplificación es el siguiente:

1. Descongelar todos los reactivos necesarios para el análisis:
   - BCR-ABL Control
   - Agua libre de nucleasas para los controles negativos (no incluido en el kit)
2. Agitar en vortex y dar spin a todos los reactivos y mantener en hielo.
3. Una vez se ha rehidratado el control, realizar diluciones seriadas 1:10 del estándar calibrado para generar la curvas estándar con tanto del gen endógeno ABL1 como del reordenamiento m-BCR-ABL1.

   El número de copias del m-BCR-ABL Control es de $25x10^4$. Se recomienda preparar las diluciones del control justo antes de realizar el ensayo.

   Realizar cuatro diluciones seriadas 1:10, añadiendo 5 µl del control positivo y 45 µl de agua, hasta obtener un control con una concentración de 25 copias.

Agitar en vortex y dar spin a cada dilución antes de preparar la siguiente dilución menos concentrada.

Después de la preparación de cada una de las diluciones, agitar en vortex y dar un spin.

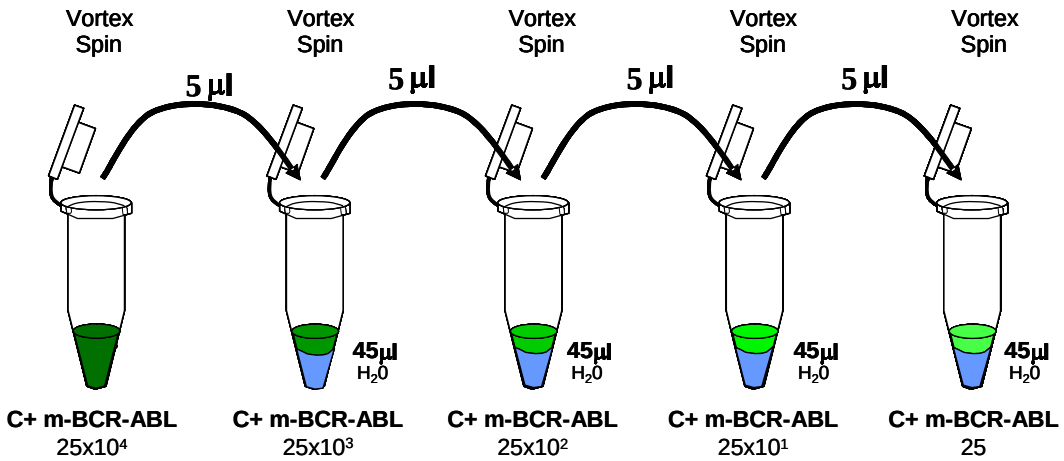

Figura 1. Diluciones seriadas 1:10 del control positivo para la obtención de las curvas patrón

7.3 Preparación de las reacciones de amplificación

Para llevar a cabo el análisis con el kit **imegen-m-BCR-ABL**, se requiere la preparación de dos masters mix de PCR.

1. Descongelar los reactivos:
   - m-BCR Master Mix
   - ABL Master Mix
   - 2x Hot Start DNA Polymerase (no incluido en el kit)
2. Agitar en vortex cada uno de los reactivos y mantener en frío.
3. 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.

m-BCR Master Mix (oncogene)

Reactivos	Volumen por reacción
M-BCR-ABL Master Mix	5 µL
2x Hot Start DNA Polymerase	10 µL

ABL1 Master Mix (reference gene)

Reactivos	Volumen por reacción
ABL1 Master Mix	5 µL
2x Hot Start DNA Polymerase	10 µL

Los volúmenes requeridos en cada mix deben ser escalados teniendo en cuenta el número de muestras que se van a analizar y las reacciones necesaria para construir la curva estándar y analizar un control negativo de PCR (*No template control*, NTC).

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.

4. Agitar en vortex los tubos que contienen los Master Mix de PCR y dispensar 15 µl en cada pocillo.
5. Una vez han sido dispensado los Master Mix de PCR, añadir los siguientes reactivos en los pocillos correspondientes:
   - 5 µL de cDNA de la muestra (en duplicado)
   - 5 µL de cada dilución de BCR-ABL Control
   - 5 µL de agua libre de nucleasas (Control negativo o NTC)

m-BCR Master Mix	
Control 25 x 10^4 copias/µl	cDNA 1_R1
Control 25 x 10^3 copias/µl	cDNA 1_R2
Control 25 x 10^2 copias/µl	cDNA 2_R1
Control 25 x 10^1 copias/µl	cDNA 2_R2
Control 25 copias/µl	NTC

ABL1 Master Mix	
Control 25 x 10^4 copias/µl	cDNA 1_R1
Control 25 x 10^3 copias/µl	cDNA 1_R2
Control 25 x 10^2 copias/µl	cDNA 2_R1
Control 25 x 10^1 copias/µl	cDNA 2_R2
Control 25 copias/µl	NTC

Figura 2. Ejemplo de la plantilla de PCR. R, replicas; NTC, no template control; pIMEGEN, BCR-ABL1 Standard.

imegen

7.4 Configuración del programa de la 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 *(ThermoFisher Scientific)*

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

Sonda	Fluoróforo	*Quencher*
m-BCR	FAM™	TAMRA
ABL	FAM™	TAMRA

Tabla 3. Información de las sondas

*En el *StepOne PCR System (ThermoFisher Scientific)* este campo deberá indicarse como "*None*"

- Programa óptimo:

Campos	Etapa 1 Activación enzimática		Etapa 2 PCR	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	1 ciclo inicial	50 ciclos	
			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*

8. Análisis de los resultados

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

CONTROLES NEGATIVOS

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

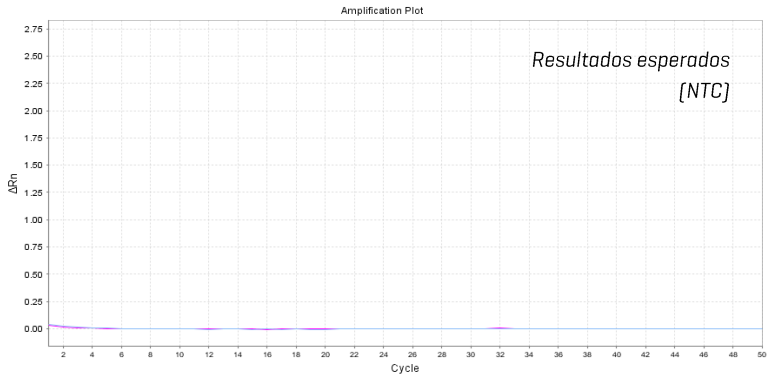

Figura 3. Resultado esperado para el control negativo (NTC)

CURVA ESTÁNDAR (pIMEGEN, BCR-ABL1 STANDARD)

- Confirmar que las diluciones seriadas preparadas utilizando el plásmido pIMEGEN producen curvas estándar adecuadas tanto para ABL1 como para m-BCR-ABL1, cuando la regresión lineal se ajusta a números de copia logarítmicos:
    a. Pendiente: Rango entre -3.1 y -3.7
    b. Coeficiente de determinación: R^2 >0,980.

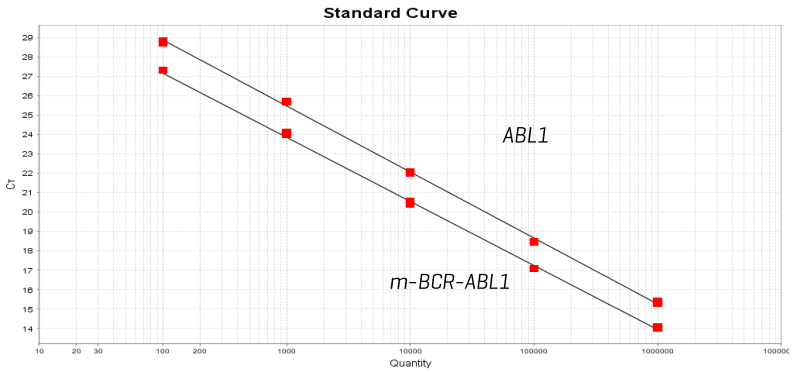

Figura 4. Regresión lineal de las curvas estándar para ABL1 y m-BCR-ABL1

- Si no se detecta amplificación en m-BCR-ABL1 Standard, consultar la Sección 9 (Troubleshooting). La concentración más alta del estándar corresponde a 25 x 10^4 copias por µl (1.250.000 copias totales), y la más baja corresponde a 125 copias totales.

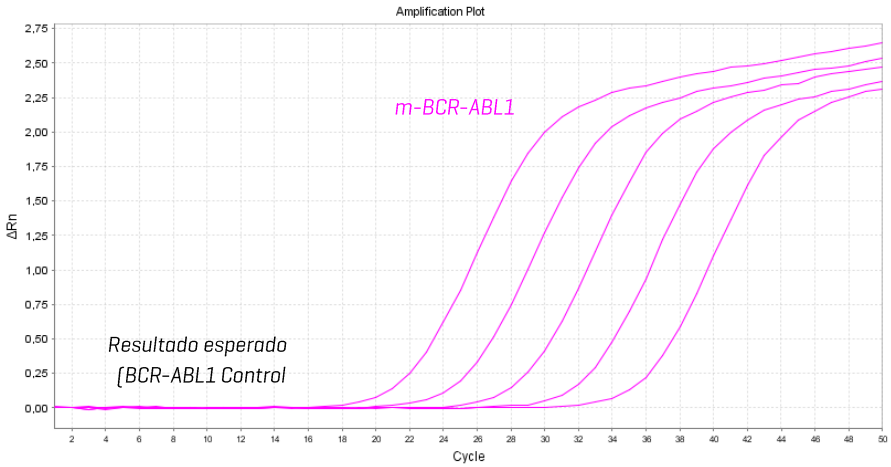

Figura 5. Diluciones seriadas utilizadas para construir la curva estándar del sistema de m-BCR-ABL1

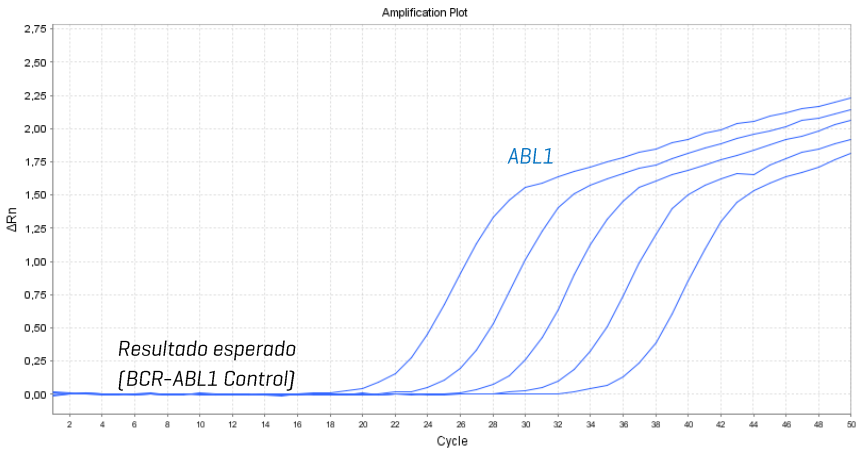

Figura 6. Diluciones seriadas utilizadas para construir la curva estándar del sistema de PCR ABL1

MUESTRAS DE cDNA

ABL1 Master Mix

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

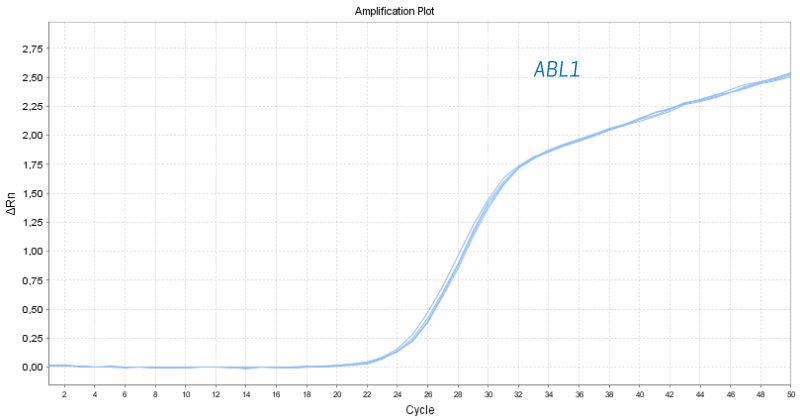

Figura 7. Resultado esperado con el sistema ABL1 para una muestra de cDNA de buena calidad

M-BCR Master Mix & ABL1 Master Mix

- Tras la verificación de todos los controles, se analizan las muestras de cDNA. La muestra analizada presenta una translocación m-BCR-ABL1 si se detecta amplificación en las reacciones preparadas con el m-BCR Master Mix, como se indica a continuación:

  <u>Muestra negativa:</u>

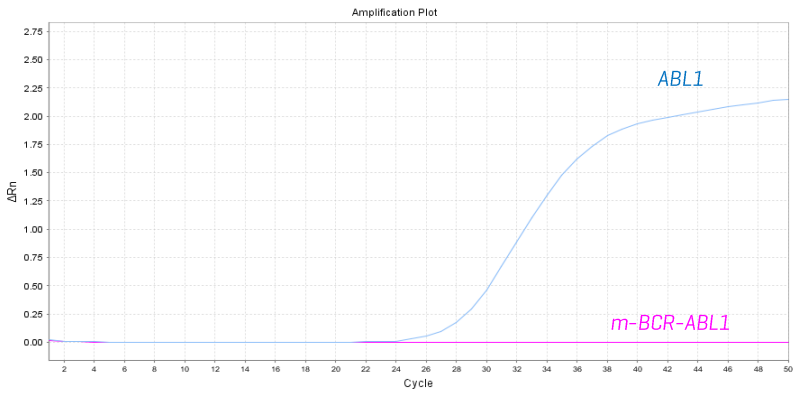

Figura 8. Resultado esperado en muestras de cDNA no patogénicas. El sistema ABL1 amplificará dicho gen, pero el sistema BCR Screening no amplificará el oncogén BCR-ABL1

Muestra positiva:

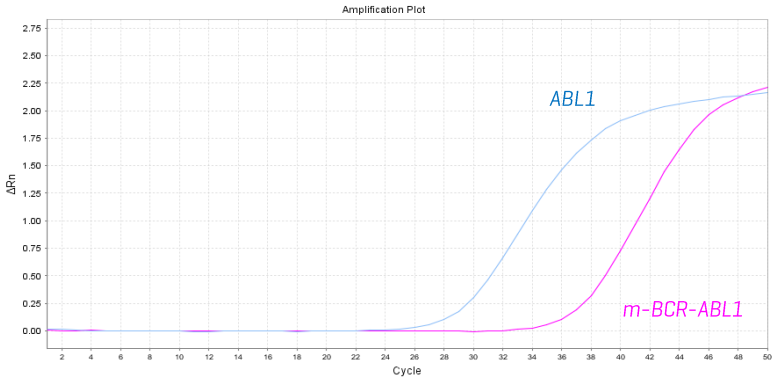

Figura 9. Resultado esperado en muestras de cDNA patogénicas. Ambos sistemas amplificarán sus dianas, tanto el gen ABL1 como el oncogén BCR-ABL1

- Las muestras tienen el reordenamiento *minor* BCR-ABL1 si hay amplificación en las reacciones preparadas con el m-BCR Master Mix. Para calcular el número de copias normalizado (NCN) se calculará el número de copias del gen de referencia (ABL1) y del reordenamiento mino BCR-ABL. La cuantificación del reordenamiento (NCN) se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\mathbf{NCN} = \frac{\mathbf{m\text{-}BCR\text{-}ABL_{CN}}}{\mathbf{ABL_{CN}}}$$

NCN = Número de copias normalizado

9. 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:

Control	*BCR-ABL*	*ABL*	*Causa*
Control Positivo	+	+	Resultado esperado
	-	-	Fallo de amplificación en la PCR [1]
Muestra a analizar	-	+	Resultado esperado
	+	+	
	-	-	Fallo de amplificación de la muestra [2]
Control Negativo de PCR	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con cDNA humano o control positivo [3]

Tabla 5. Interpretación de los posibles resultados del kit imegen BCR-ABL

[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 m-BRC-ABL ha sido validado con los siguientes equipos de PCR a tiempo real:

- StepOne Plus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
- 7500 FAST Real-Time PCR System (ThermoFisher 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 m-BRC-ABL** 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.
- TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (ThermoFisher 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.