imegen

Bringing genomics to health

CE IVD

Instrucciones de Uso

imegen® MPL

Detección de mutaciones W515L y W515K en el gen *MPL* mediante PCR en tiempo real

REF IMG-236

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 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® MPL 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 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 in vitro.
Versión 03	Mejora de la sensibilidad analítica del ensayo.
Versión 04	Ajuste del input de ADN genómico.
Versión 05	Mejora de la especificidad del ensayo
Versión 06	Interpretación de resultados

imegen

Índice

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

imegen

1. Información general

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) son un tipo de cáncer crónico de la línea mieloide en el que existe una sobreproducción de precursores de células sanguíneas en un estado avanzado de maduración.

El receptor de trombopoyetina (MPL o CD119, localizado en 1p34) se encuentra mutado en alrededor del 8-9% de las trombocitemias esenciales y mielofibrosis primarias que carecen de mutaciones en JAK2, el cual es el evento oncogénico principal de este tipo de cáncer[1,2]. El receptor de trombopoyetina es una proteína transmembrana de 635 aminoácidos con 2 dominios extracelulares receptores de citoquinas. Tras la unión del ligando trombopoyetina, MPL homodimeriza, disparando la activación de la ruta de señalización JAK-STAT. El correcto funcionamiento de esta ruta de señalización es crucial para la formación de megacariocitos y plaquetas.

Las mutaciones de MPL en las NMPs afectan específicamente al codón 515 en el exón 10, siendo las mutaciones W515K y W515L las formas mutantes más frecuentes.

Referencias

- Beer, P. A. et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: Analysis of the PT-1 cohort. Blood 112, 141–149 (2008).
- Pikman, Y. et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med. 3, 1140–1151 (2006).

imegen

2. Uso previsto

El kit imegen-MPL está dirigido al diagnóstico de las mutaciones W515L (NM_005373.2:c.1544G>T) y W515K (NM_005373.2:c.1543_1544delTGinsAA) en el gen MPL mediante un ensayo cualitativo de PCR a tiempo real.

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

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

3. Características técnicas

El kit imegen-MPL 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 MPL 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) de los sistemas se ha establecido en un 1% para cada una de las mutaciones W515L y W515K.

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 100 ng.

Este producto cumple con los requisitos de calidad especificados por la ISO 13845 en lo referente a los materiales empleados en su proceso de fabricación.

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.

5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

El kit contiene los siguientes reactivos necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR con cada Master Mix específico.

- MPL Master Mix (W515K/W515L): Master Mix específico para cada mutación. Cada Master Mix contiene los oligonucleótidos y sondas, para llevar a cabo la amplificación. La detección específica de la mutación MPL procede de una sonda marcada con el fluorocromo FAM™. Además, ambos sistemas incluyen una sonda marcada con el fluorocromo VIC™ para la detección específica del gen endógeno, β-globina.
- General Master Mix: Master Mix de PCR con los nucleótidos, $MgCl_2$, enzima y buffer necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real.
- Controles positivos (Control MPL W515K o Control MPL W515L): Controles positivos que contienen la secuencia para la amplificación de las mutaciones objeto de análisis, W515K y W515L.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
MPL W515K Master Mix	Disco rojo	180 µl	-20ºC
MPL W515L Master Mix	Disco amarillo	180 µl	-20ºC
General Master Mix	Disco blanco	600 µl	4ºC
MPL W515K Control	Tapa roja	25 µl	-20ºC
MPL W515L Control	Tapa amarilla	25 µl	-20ºC

Tabla 1. Componentes del kit imegen-MPL

6. Equipos y materiales necesarios que no se suministran

Equipos:

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

Reactivos:

- Agua libre de nucleasas

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 µL, 20 µL y 200 µL)
- 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-235 imegen-NPM1
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 tubos de 1.5 mL preparar los dos mixes de PCR como se especifica a continuación:

	Cantidad por reacción	
Reactivos	MPL W515L Master Mix	MPL W515K Master Mix
MPL W515L Master Mix	7.5 µL	-
MPL W515K Master Mix	-	7.5 µL
General Master Mix	12.5 µL	12.5 µL

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 a los mixes de PCR y dispensar 20 µL en los correspondientes pocillos del material fungible óptico.
5. Una vez dispensados los mixes de PCR añadir a los pocillos correspondientes:
   - 5 µL de las muestras de ADN genómico (10 ng/µL)
   - 5 µL del control positivo
   - 5 µL de agua libre de nucleasas (control negativo de PCR)

   Nota: Se recomienda añadir un control negativo de PCR por master mix para descartar la contaminación de los reactivos, y también un control positivo por master mix 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

- Fluoróforos de las sondas de hidrólisis:

Sonda	Emisor	Genotipado	*Quencher*
W515L-P	FAM™	W515L-P	MGB
W515K-P	FAM™	W515K-P	MGB
B-Globina-P	VIC™	*B-Globina*	MGB

Tabla 2. Información de las sondas de hidrólisis

7500 FAST and StepOne Plus Real-time PCR System (Applied Biosystems)

- Tipo de experimento: Quantitation-Standard Curve
- Velocidad de rampa: Standard
- Volumen de reacción: 25 µL
- Referencia basal ROX™: incluída

Programa óptimo:

Campos	Etapa 1 Activación enzimática	Etapa 2 PCR	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	45 ciclos	
		Desnaturalización	Unión de oligonucleótido/ Extensión
Temperatura	95ºC	95ºC	64ºC
Tiempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto*

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne Plus (Applied Biosystem)

*Detección de la fluorescencia

LightCycler 480 Real-time PCR System (Roche)

- Experiment: Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe
- Reaction volume: 25 µL
- Analyses: Abs Quant / Fit Poitns

Programa de PCR óptimo:

Campos	Etapa 1	Etapa 2		
	Activación enzimática	PCR		
Ciclos	1 ciclo inicial	**45 ciclos**		
		Desnaturalización	Anillamiento	Extensión
Temperatura	95ºC	95ºC	64ºC	72ºC
Tiempo	10 minutos	15 segundos	30 segundos *	30 segundos

Table 4. Programa de PCR óptimo para el LightCycler 480 PCR System (Roche).

* Detección de la fluorescencia

8. Análisis de resultados

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

- Comprobar que en los controles negativos de PCR no haya 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 los controles positivos haya amplificación de la mutación MPL, W515K o W515L, en función del Master Mix analizado (canal del fluoróforo FAM) y del gen de referencia, β-globina (canal VIC) en los controles positivos.
- Comprobar que en todas las muestras analizadas existe amplificación del gen β-globina (VIC). La no amplificación de β-globina será un indicador de baja calidad del ADN en la muestra e invalidará la obtención de ninguna conclusión.
- Para analizar las muestras hay que emplear un software específico del termociclador de PCR a tiempo real utilizado. Se recomienda ajustar el threshold en 0.1 en equipos de Applied Biosystem, y fijar la señal de fluorescencia basal manualmente en equipos de Roche utilizando la aplicación de Noise band.

A continuación se muestran los posibles resultados obtenidos con el kit imegen-MPL.

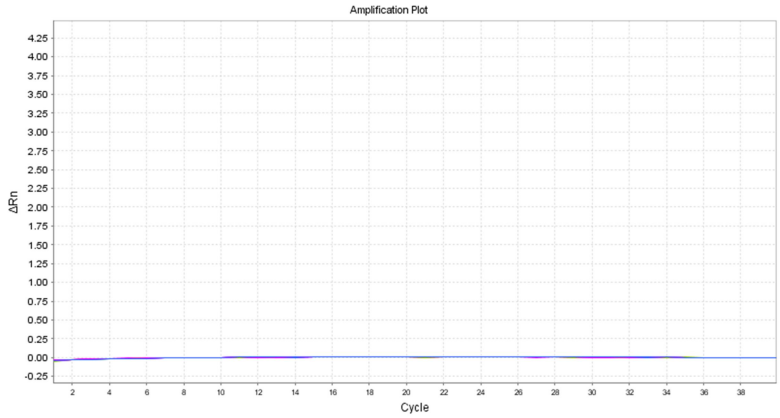

Figura 1. Resultado esperado en los controles negativos de PCR. No se observa señal de amplificación en ningún canal de fluorescencia.

SISTEMA W515K

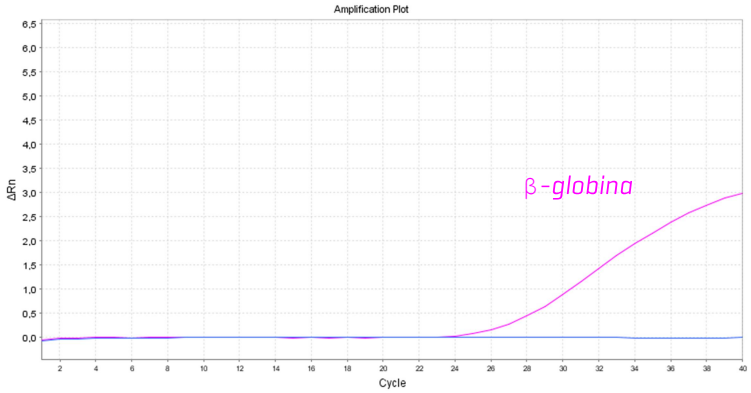

Figura 2. Resultado obtenido a partir de una muestra de ADN sin la mutación diana del sistema. Sólo se observará amplificación en el canal VIC (*B-globina*, se muestra en rosa).

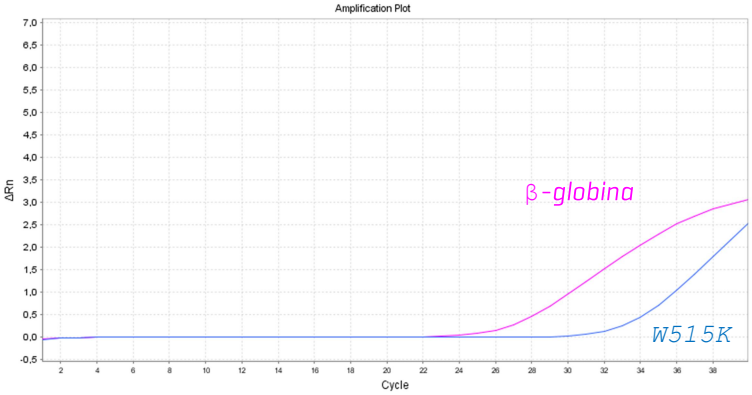

Figura 3. Resultado obtenido a partir de una muestra con el 5% del gen *MPL* mutado (W515K). Se observará amplificación en ambos canales (en este gráfico *B-globina* se muestra en rosa, y *MPL-W515K* se muestra en azul).

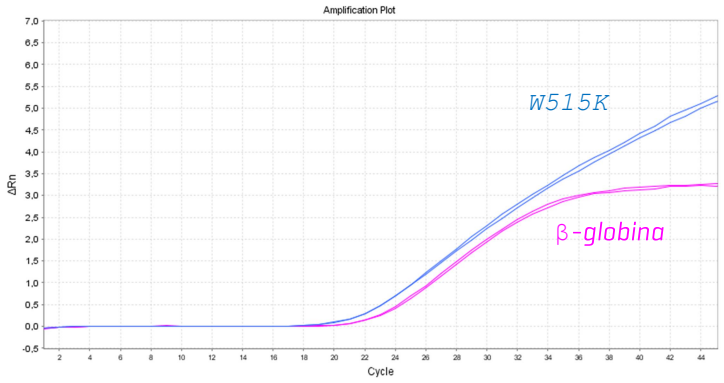

Figura 4. Resultado obtenido a partir del control positivo. La amplificación de *MPL-W515L* se muestra en azul.

SISTEMA W515L

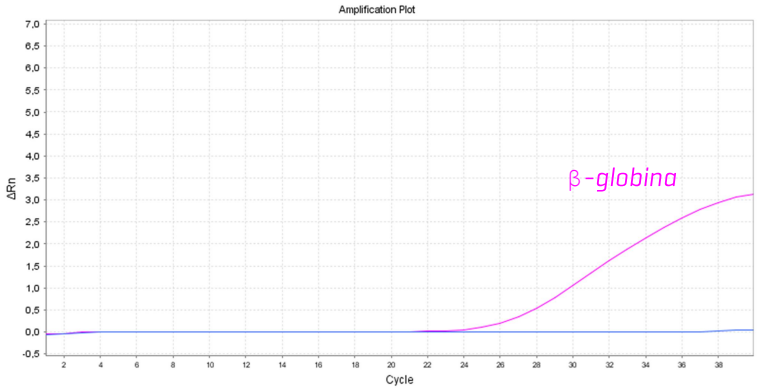

Figura 5. Resultado obtenido a partir de una muestra de ADN sin la mutación diana del sistema. Sólo se observará amplificación en el canal VIC (*B-globina*, se muestra en rosa).

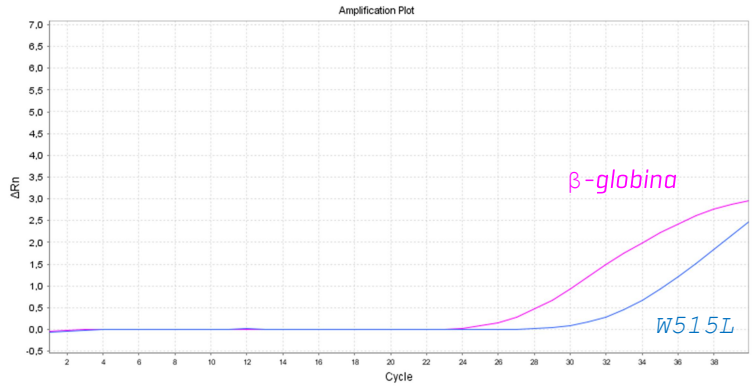

Figura 6. Resultado obtenido a partir de una muestra con el 5% del gen *MPL* mutado (W515L). Se observará amplificación en ambos canales (en este gráfico *B-globina* se muestra en rosa, y *MPL-W515L* se muestra en azul).

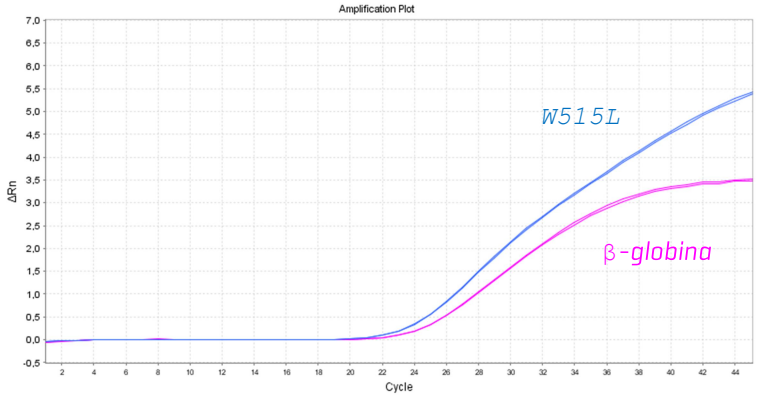

Figura 7. Resultado obtenido a partir del control positivo. Se detecta amplificación para *MPL-W515L* mutado. La amplificación de *MPL-W515L* se muestra en azul.

9. Troubleshooting

La siguiente tabla representa los resultados que podrían obtenerse usando los controles positivos, 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	MPL	B-globina	Resultado / Interpretación
Controles Positivos	+	-	Resultado esperado
	-	-	Fallo en la configuración de la PCR [1]
Muestra ADN	-	+	Resultado esperado
	+	+	
	-	-	Fallo de amplificación de las muestras de ADN [2]
Control Negativo (NTC)	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación con ADN humano o con el control positivo [3]

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

[1] 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.

[2] 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.

[3] Contaminación con ADN humano o con el control positivo : La contaminación de la PCR podría ser causada por un manejo inadecuado de la muestra, el uso de reactivos contaminados o por una contaminación ambiental. Para resolver este problema, se recomienda una limpieza completa del laboratorio donde se preparan las PCR, incluido el equipo y el material utilizado. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR y prepare finalmente las reacciones de PCR que contienen los controles positivos para evitar cualquier contaminación cruzada.

10. Limitaciones

10.1 Equipos

Imegen-MPL ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- 7500 FAST Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
- StepOne Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
- LightCycler 480 Instrument II (Roche Life Science)

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-MPL 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.