



Instrucciones de uso

Imegen[®] M-BCR-ABL1

Ref. IMG-121

CE IVD

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 le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

Nuestros productos están diseñados para diagnóstico *in vitro*. Health in Code 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, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de estos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. Health in Code 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 son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit **Imegen® M-BCR-ABLI** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

 +34 963 212 340

 tech.support@healthincode.com

Imegen® es una marca registrada de Health in Code en España.

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)

Versión 05	NOV 2022	Cambio de dirección del fabricante: Health in Code S.L., Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España.
Versión 04	SEP 2022	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a HEALTH IN CODE, S.L.
Versión 03	AGO 2018	Actualización por marcado CE/IVD del producto

índice

01	Información General	4
02	Uso previsto	5
03	Características técnicas	6
04	Advertencias y precauciones de seguridad	7
05	Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	8
06	Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran	9
07	Protocolo de ensayo	10
07.1	Preparación de reactivos de PCR	10
07.2	Preparación de las curva patrón	10
07.3	Preparación de las reacciones de amplificación	11
07.4	Configuración del programa de la PCR	12
08	Análisis de los resultados	14
09	Troubleshooting	18
10	Limitaciones	19
10.1	Equipos	19
10.2	Reactivos	19
10.3	Estabilidad del producto	19
11	Calibración IRMM	20

01 Información general

La translocación entre BCR-ABL1 o translocación del cromosoma Filadelfia es una alteración génica que suele estar presente en la mayoría de los pacientes con leucemia mieloide crónica (CML) 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 oncogen 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/ABL1:

- **M-BCR-ABL1:** cuando se fusionan b3/a2 o a3 y b2/a2 y a3 se genera una tirosina quinasa quimérica de 210 kDa (p210).
- **m-BCR-ABL1:** cuando se fusionan e1/a2 o a3 se genera una tirosina quinasa quimérica de 190 kDa (p190).
- **p230:** cuando se fusionan e19/a2 o a3 se genera una tirosina quinasa quimérica de 230 kDa.

Además, en la bibliografía se han descrito otros dos reordenamientos mucho menos frecuentes:

- **e6/a2 o a3**
- **e8/a2 o a3**

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

02 Uso previsto

El kit **Imegen® M-BCR-ABL1** emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis para la amplificación y cuantificación del reordenamiento M-BCR-ABL1 (p210) 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.

El calibrador estandarizado disponible en el *Institute of Reference Materials and Measurements (IRMM)*, Bélgica: número de catálogo ERM-AD623;

<https://web.jrc.ec.europa.eu/rmcatalogue/searchrmcatalogue.do>, se utiliza en la calibración del plásmido pIMEGEN (M-BCR-ABL1:ABL1 en un ratio de copias 1:1), que se utiliza como estándar para la cuantificación realizada con el kit **Imegen® M-BCR-ABL1**.

Imegen® M-BCR-ABL1 es sólo para uso en diagnóstico *in vitro* y están dirigidos a profesionales del sector de la biología molecular.

03 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 llevada a cabo usando 1 µg de RNA 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, 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 ABL como para el reordenamiento M-BCR-ABL1. Este kit es adecuado para detectar una respuesta molecular (MR) correspondiente a una reducción de 4.5 log del Estudio Aleatorizado Internacional, definido como:

- ◇ Enfermedad detectable $\leq 0.0032\%$ BCR-ABL1
- ◇ Enfermedad indetectable en cDNA con $\geq 32,000$ copias del gen de referencia ABL1

Health in Code 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

04 Advertencias y precauciones

- ◇ Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
- ◇ No pipetear con la boca.
- ◇ No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
- ◇ Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
- ◇ No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
- ◇ En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
- ◇ Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
- ◇ Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
- ◇ Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
- ◇ Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.
- ◇ El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por Health in Code S.L.
- ◇ El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por Health in Code S.L., por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.

05

Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

El kit contiene los siguientes reactivos necesarios para llevar a cabo las 48 reacciones de PCR a tiempo real:

- **M-BCR Master Mix:** Oligonucleótidos y sondas de hidrólisis (FAM™) específicos para detectar el reordenamiento M-BCR-ABL.
- **ABL1 Master Mix:** Oligonucleótidos y sondas de hidrólisis (FAM™) específicos para detectar el gen de referencia ABL1.
- **M-BCR-ABL1 Standard (pIMEGEN):** Plásmido una concentración de 30×10^4 copias/ μ l de M-BCR-ABL1 y ABL1 en un ratio 1:1.

Reactivos	Color	Viales	Conservación
M-BCR Master Mix	Disco verde	2 x 24 reacciones	4°C
ABL1 Master Mix	Disco amarillo	2 x 24 reacciones	4°C
M-BCR-ABL1 Standard	Tapa verde	4 viales	4°C

Tabla 1. Componentes del kit Imegen® M-BCR-ABL1

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

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real (canales FAM y VIC)
- Micropipetas (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- *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 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Material fungible óptico compatible con el termociclador de PCR a tiempo real
- Guantes de látex

Kits complementarios

Health in Code proporciona un 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-122 *Imegen® m-BCR-ABL1*

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de los reactivos

Todos los reactivos incluidos en el kit están liofilizados. El primer paso antes de utilizar nuestros kits consistirá en rehidratar los reactivos añadiendo la cantidad de agua, libre de nucleasas, recogida en la siguiente tabla. Con el objetivo de facilitar la resuspensión de cada componente, se recomienda agitar y dar un *spin* a los tubos que contienen los reactivos y conservarlos a 4°C durante una hora antes de su uso.

Reactivos	Rehidratación
M-BCR Master Mix	130 µL de agua/vial*
ABL1 Master Mix	130 µL de agua/vial*
M-BCR-ABL1 Standard	50 µL de agua/vial*

Tabla 2. Volumen de rehidratación de los componentes del kit

(* Si estos reactivos no van a ser utilizados tras la rehidratación, recomendamos conservarlos a -20°C.

07.2 | Preparación de las curvas patrón

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

- 01 Descongelar todos los reactivos necesarios para el análisis:
 - ◇ M-BCR-ABL1 Standard (pIMEGEN)
 - ◇ Agua libre de nucleasas para los controles negativos (no incluido en el kit)
- 02 Agitar en *vortex* y dar *spin* a todos los reactivos y mantener en hielo.
- 03 Preparar las diluciones del estándar pIMEGEN calibrado con el estándar del IRMM para generar las curvas estándar con el número de copias de ABL1 y M-BCR-ABL1 conocido.

Una vez se ha rehidratado el estándar pIMEGEN, realizar diluciones seriadas para construir la recta patrón que permitirá calcular el número de copias, tanto del gen de referencia ABL1 como del reordenamiento M-BCR-ABL1.

Preparar cuatro diluciones seriadas 1/10, mezclando 5 µL de control positivo y 45 µL de agua libre de nucleasas. A continuación, realizar una dilución 1/3, para preparar el punto menos concentrado de la curva, equivalente a 50 copias totales, cuando se utiliza el volumen recomendado del estándar (5 µL de cada dilución de pIMEGEN).

Agitar en *vortex* y *spin* cada dilución antes de preparar la siguiente dilución menos concentrada:

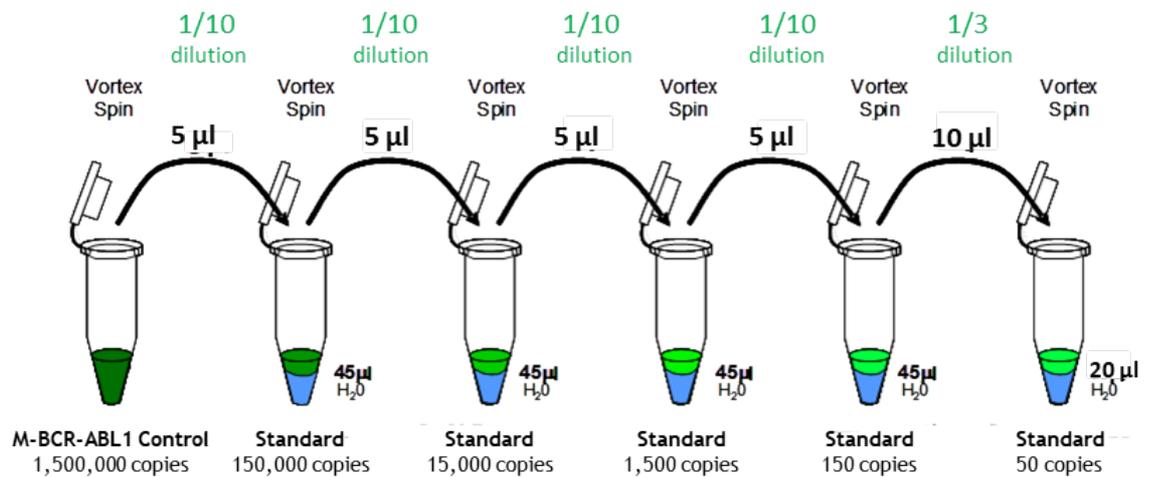


Figura 1. Protocolo para la preparación de la curva estándar utilizando M-BCR-ABL1 Standard

07.3 | Preparación de las reacciones de amplificación

Para llevar a cabo el análisis con el kit **Imegen® M-BCR-ABL1**, se requiere la preparación de dos *master mix* de PCR independientes:

01 Descongelar los reactivos:

- ◇ *M-BCR Master Mix*
- ◇ *ABL Master Mix*
- ◇ *2x Hot Start DNA Polymerase* (no incluido en el kit)

02 Agitar en *vortex* cada uno de los reactivos y mantener en frío.

03 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-ABL1 Master Mix (Oncogén)*

Reactivo	Volumen por reacción
<i>M-BCR Master Mix</i>	5 µL
<i>2x Hot Start DNA Polymerase</i>	10 µL

➤ *ABL1 Master Mix (Gen de referencia)*

Reactivo	Volumen por reacción
<i>ABL1 Master Mix</i>	5 µL
<i>2x Hot Start DNA Polymerase</i>	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 necesarias para construir

la curva estándar (pIMEGEN) 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.

- 04 Agitar en *vortex* los tubos que contienen los *Master Mix* de PCR y dispensar 15 µl en cada pocillo.
- 05 Una vez han sido dispensados 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 M-BCR-ABL1 Standard (pIMEGEN)
 - ◇ 5 µl de agua libre de nucleasas (Control negativo o NTC)

M-BCR Master Mix		ABL1 Master mix	
pIMEGEN 30 x 10 ⁴ copias/µl	cDNA 1_R1	pIMEGEN 30 x 10 ⁴ copias/µl	cDNA 1_R1
pIMEGEN 30 x 10 ³ copias/µl	cDNA 1_R2	pIMEGEN 30 x 10 ³ copias/µl	cDNA 1_R2
pIMEGEN 30 x 10 ² copias/µl	cDNA 2_R1	pIMEGEN 30 x 10 ² copias/µl	cDNA 2_R1
pIMEGEN 30 x 10 ¹ copias/µl	cDNA 2_R2	pIMEGEN 30 x 10 ¹ copias/µl	cDNA 2_R2
pIMEGEN 30 copias/µl	NTC	pIMEGEN 30 copias/µl	NTC
pIMEGEN 10 copias/µl		pIMEGEN 10 copias/µl	

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

07.4 | Configuración del programa PCR

Para llevar a cabo la PCR a tiempo real, se deberán seguir las siguientes instrucciones para configurar el programa de amplificación:

➤ 7500 Fast o StepOne Real-Time PCR system (Thermo Scientific)

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

Sonda	Fluoróforo	Quencher
M-BCR	FAM™	TAMRA
ABL1	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	
	1 ciclo inicial	1 ciclo inicial	50 ciclos	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	1 ciclo inicial	Desnaturalización	Unión de cebadores / Extensión
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto*

Tabla 4. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne

(*) Detección de la fluorescencia

08 Análisis de los resultados

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

CONTROLES NEGATIVOS

- ➔ 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.

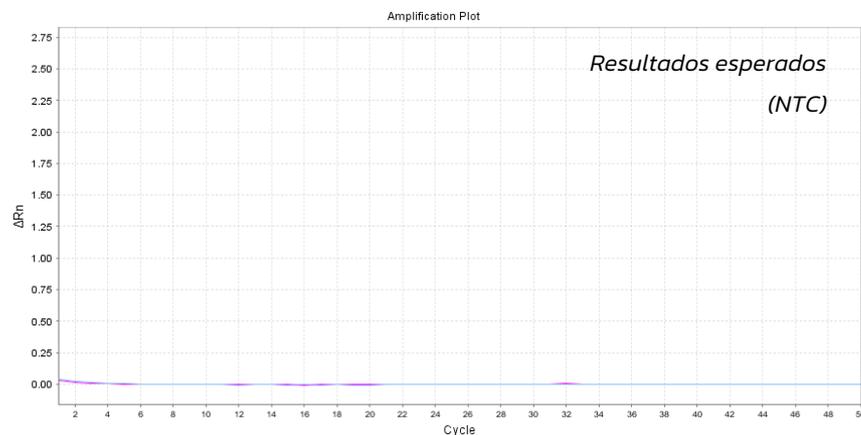


Figura 3. Resultado esperado para el control negativo (NTC)

CURVA ESTÁNDAR (pIMEGEN, M-BCR-ABL1 STANDARD)

- ➔ Comprobar 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.
 - ◇ Pendiente: Rango entre -3.1 y -3.7
 - ◇ Coeficiente de determinación: $R^2 > 0,980$.

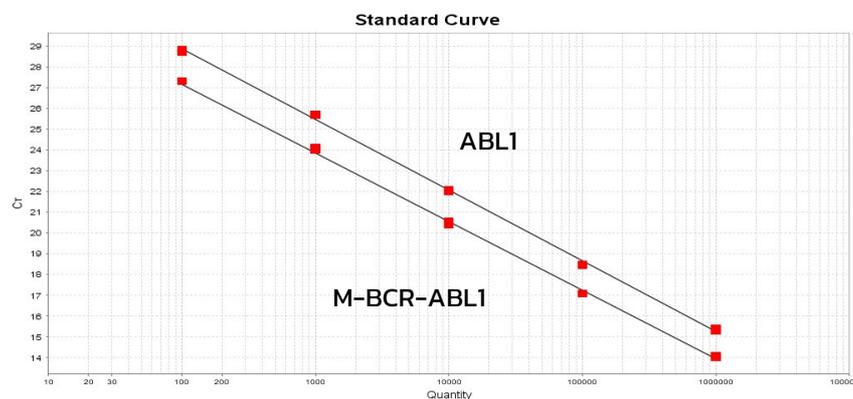


Figura 4. Regresión lineal de las curvas estándar para ABL1 y M-BCR-ABL1

- ➔ Si no se detecta amplificación en *M-BCR-ABL1 Standard*, consultar la Sección 9 (*Troubleshooting*). La concentración más alta del estándar corresponde a 30×10^4 copias por μl (1.500.000 copias totales), y la más baja corresponde a 10 copias por μl (50 copias totales).

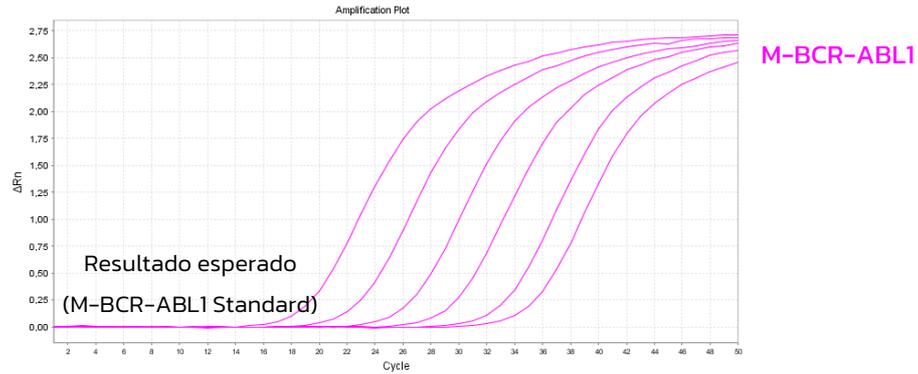


Figura 5. Diluciones seriadas utilizadas para construir la curva estándar del sistema de PCR M-BCR-ABL1

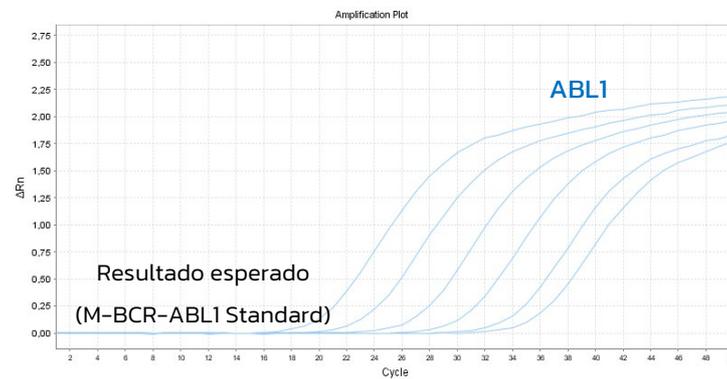


Figura 6. Diluciones seriadas utilizadas para construir la curva estándar del sistema de PCR ABL1

➤ MUESTRAS (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.

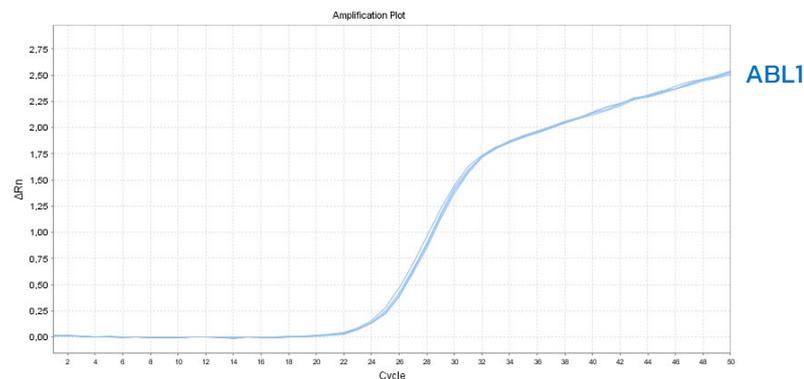


Figura 7. Resultado esperado con el sistema ABL1 para una muestra de cDNA de buena calidad.

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 BCR-ABL1 si se detecta amplificación en las reacciones preparadas con el *M-BCR Master Mix*, como se indica a continuación.

◇ Muestra negativa

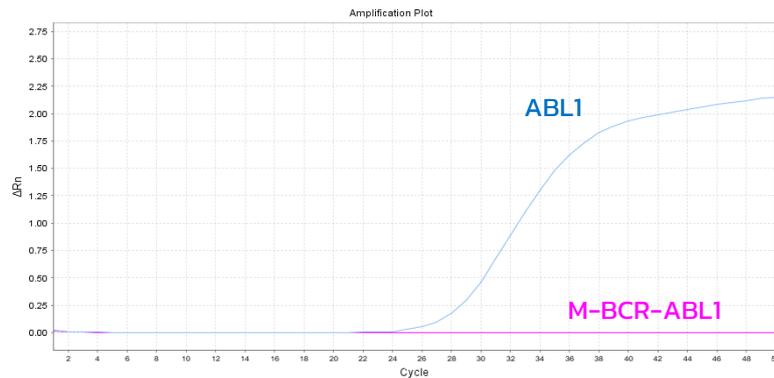


Figura 8. Resultado esperado en muestras de cDNA no patogénicas. El sistema ABL1 amplificará dicho gen, pero el sistema BCR Screening no amplificará el oncogén M-BCR-ABL1.

◇ Muestra positiva

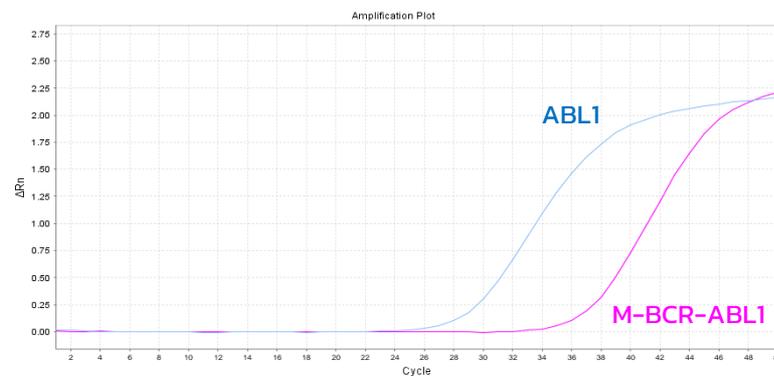


Figura 9. Resultado esperado en muestras de cDNA patogénicas. Ambos sistemas amplificarán sus dianas, tanto el gen ABL1 como el oncogén M-BCR-ABL1

➔ Las muestras tienen el reordenamiento *M-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 *M-BCR-ABL1*. La cuantificación del reordenamiento (NCN) se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$NCN = \frac{M - BCR - ABL1_{CN}}{ABL1_{CN}} \times CF$$

NCN = Número de copias normalizado
CF = Factor de Conversión

Para poder comparar los resultados, se ha propuesto una Escala Internacional (IS) para M-BCR-ABL1 basada en la implementación de factores de conversión (CF) específicos y el

uso de kits calibrados de acuerdo con el sistema internacional. Para cumplir con la recomendación, el plásmido pIMEGEN (*M-BCR-ABL1 Standard*) se calibra utilizando el plásmido estándar ERM AD623 BCR-ABL1 por PCR digital multiplexada (dPCR; *QuantStudio 3D Digital PCR System*).

Además, cada lote producido se evalúa con un estricto control de calidad y se proporciona junto con un factor de conversión (CF) para conmutar el número de copia normalizado (NCN) basado en un valor de número de copia corregido tanto para el gen de referencia (ABL1) como para el reordenamiento *M-BCR-ABL1* (p210).

09 Troubleshooting

La siguiente tabla representa los resultados que podrían obtenerse usando los controles positivos (*M-BCR-ABL1 Standard*) y negativos y las muestras de cDNA. 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	M-BCR-ABL1	ABL1	Resultado / Interpretación
pIMEGEN (<i>M-BCR-ABL1 Standard</i>)	+	+	Resultado esperado
	-	-	Fallo en la configuración de la PCR ¹
Muestra cDNA	-	+	Resultado esperado
	+	+	
	-	-	Fallo de amplificación de las muestras de cDNA ²
Control negativo (NTC)	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación con cDNA humano o con el estándar ³

Tabla 5. Interpretación de los posibles resultados obtenidos utilizando Imegen®-M-BCR-ABL1

(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.

(2) **Fallo de amplificación de la muestra de cDNA:** un fallo de amplificación del gen de referencia en la muestra de cDNA podría sugerir que la cantidad o la calidad de la muestra de cDNA está comprometida. En esta situación, se recomendaría un segundo análisis, extracción de ARN o síntesis de muestras nuevas de cDNA antes de realizar una interpretación de los resultados.

(3) **Contaminación con cDNA humano o con el control positivo (Standard):** 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® M-BCR-ABL1 ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR a tiempo real:

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

Técnicamente, el kit es compatible con cualquier equipo de PCR a tiempo real que permita la detección de fluorescencia emitida por el fluoróforo FAM™.

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® M-BCR-ABL1 se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y las ADN polimerasas recomendadas por el fabricante de los termocicladores de PCR a tiempo real utilizados en la validación:

- + *M-MLV RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)*
- + *TaqMan Environmental Master Mix 2.0* (ThermoFisher Scientific)

Si va a utilizar una enzima de PCR diferente de la ADN polimerasa utilizada en la validación para realizar el análisis, se recomienda realizar una validación previa con los nuevos reactivos. Por favor, contacte a nuestro Equipo de Soporte Técnico si necesita más información.

Además, este kit no incluye los reactivos para la extracción de ARN o la retrotranscripción de ARN a cDNA. Para obtener resultados óptimos, se recomienda seguir las guías locales para el análisis de M-BCR-ABL1.

10.3 | Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas en la sección 5 (Contenido y almacenamiento del kit) de este manual.

11 Calibración IRMM

Según la *European LeukemiaNet* (ELN) para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide crónica, se ha implementado una Escala Internacional para M-BCR-ABL1 para expresar los resultados de acuerdo con un calibrador estandarizado y trazable del Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (IRMM), Bélgica: número de catálogo ERM-AD623.

Para cumplir con esta recomendación, Health in Code ha calibrado internamente el plásmido pIMEGEN con el plásmido ERM AD623 BCR-ABL1. Ambos contienen M-BCR-ABL1 y ABL1 en una proporción de 1:1. La calibración se ha realizado en base al número de copias absolutas de M-BCR-ABL1 y ABL1 por PCR digital multiplexada (dPCR; *QuantStudio 3D Digital PCR System*). Además, cada lote producido se evalúa con un estricto control de calidad y se proporciona junto con un factor de conversión (CF) para determinar el número de copia normalizado (NCN) basado en un valor de número de copia corregido para ambos, gen de referencia (ABL1) y el reordenamiento M-BCR-ABL1 (p210).

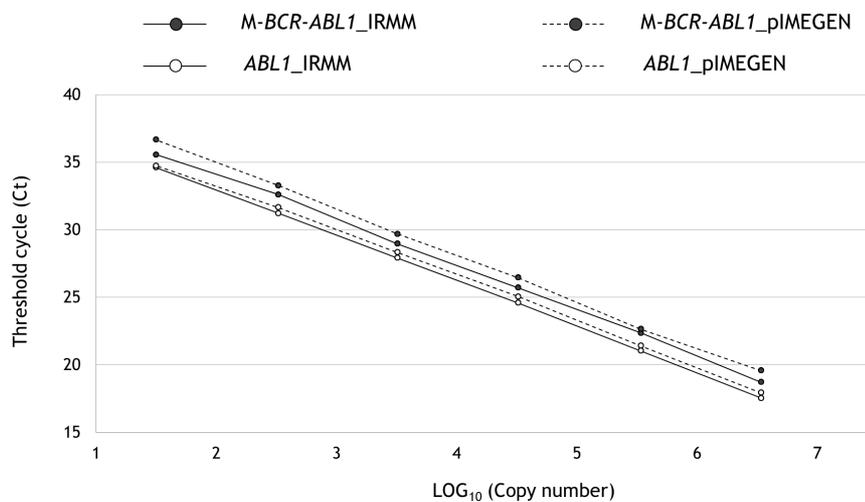


Figura 9. Detalles funcionales de los estándares pIMEGEN y del IRMM

M-BCR-ABL1_IRMM	Slope: -3.389, Y-Inter: 38,09, R ² : 0.999
ABL1_IRMM	Slope: -3.357, Y-Inter: 39.14, R ² : 0.999
M-BCR-ABL1_pIMEGEN	Slope: -3.372, Y-Inter: 38.41, R ² : 0.999
ABL1_pIMEGEN	Slope: -3.391, Y-Inter: 39.95, R ² : 0.999

La comparación funcional del estándar del IRMM y del estándar pIMEGEN se analizó mediante PCR en tiempo real, evaluando la pendiente de la regresión lineal, el intercepto en Y (Y-Inter) y el coeficiente de determinación (R²) de cada sistema, cualidades altamente dependientes de los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis utilizadas.

Referencia

- > Cross, N. C. P. et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 29, 999–1003 (2015).

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



Conoce todos nuestros
kits de diagnóstico

