



imegen

Bringing
genomics
to health



Instrucciones de uso

imegen[®] PML-RARA Screening

Detección del reordenamiento *PML-RARA*
t(15;17)(q22;q21) mediante PCR a tiempo real

REF **IMG-130**

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

Rev. 3. 12/02/2019



Página 1 de 17



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 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 PML-RARA Screening** 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: +34 963 212 340

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 <i>in vitro</i> .



imegen

Índice

1. Información general	4
2. Uso previsto	5
3. Características técnicas	6
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 reacciones de amplificación	10
7.3 Configuración del programa de la PCR a tiempo real	12
8. Análisis de los resultados	13
9. Troubleshooting	16
10. Limitaciones	17
10.1 Equipos	17
10.2 Reactivos	17
10.3 Estabilidad del producto	17



imegen

1. Información general

La translocación t(15; 17) [q22; q21] se produce entre los cromosomas 15 y 17 y da lugar a la fusión del gen del receptor alfa del ácido retinoico (RARA) situado en el cromosoma 17 y del gen PML situado en el cromosoma 15.

El gen PML, codifica una proteína que actúa como un supresor de tumor, mientras que el oncogén de fusión *PML-RARA* es incapaz de bloquear la proliferación celular o inducir la apoptosis y ejerce sus efectos oncogénicos mediante la represión de la expresión de genes AR-inducibles críticos para la diferenciación mieloide.

El 95% de los casos de Leucemia Promielocítica Aguda (APL), un tipo de leucemia mieloide aguda, posee una translocación PML-RAR α la cual está asociada a una prognosis favorable.

Dada la variabilidad en los puntos de ruptura en PML [intrón 6, exón 6 o intrón 3], tres transcritos de fusión de PML-RAR α : bcr1, bcr2 y bcr3, han sido identificados. Representan el 55%, 5% y 40% de los casos de APL, respectivamente.

Se encuentra en el 95% de las leucemias agudas promielocíticas (APL), donde PML-RARA ejerce sus efectos oncogénicos mediante la represión de la expresión de genes AR-inducibles críticos para la diferenciación mieloide.

References

- Leukemia. 2003; Volume 17: 2318-2357. doi:10.1038/sj.leu.2403135



imegen

2. Uso previsto

Imegen PML-RARA Screening emplea una combinación de cebadores y sondas de hidrólisis fluorescentes validadas mediante PCR a tiempo-real para amplificar las variantes bcr1, bcr2 y bcr3 del reordenamiento *PML-RAR α* , resultantes de la translocación entre el cromosoma 15 y 17, t[15;17](q22q21), y el gen de referencia *GUS*. Este análisis permitirá detectar la presencia o no de dichas translocaciones, sin embargo no permite discriminar cuál de ellas está presente en la muestra ni en qué proporción, puesto que se trata de un análisis cualitativo.

El tipo de muestra necesaria para este estudio es ADN complementario [cDNA]. Previa obtención del cDNA, se deberá extraer el ARN total de las células de muestras de sangre periférica o médula ósea, a partir del cual poder realizar la retro transcripción a cDNA.

Los resultados permitirán orientar al clínico en el diagnóstico del tipo de leucemia que padece el paciente.

Imegen PML-RARA Screening es sólo para uso diagnóstico *in vitro* y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.



imegen

3. Características técnicas

Imegen -PML-RARA Screening ha sido validado utilizando muestras de cDNA sintetizadas por retrotranscripción total de RNA extraído a partir de sangre periférica de pacientes sanos y diagnosticados con Leucemia Promielocítica Aguda [LPA], detectando específicamente los productos de fusión y el gen de referencia *GUS* definidos en la Sección 2 de este documento [Uso previsto].

El límite de detección, tanto de la diana *PML-RARA* como de *GUS* es de 5 copias absolutas.

Este producto cumple con los requisitos de calidad especificados por la ISO 13485, tanto los materiales empleados en su proceso de fabricación como el producto final comercializado, y son estables analítica y funcionalmente durante el periodo hábil del producto siempre que se sigan las instrucciones de conservación y uso especificadas en el apartado 5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit, de este manual.



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.



imegen

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 por cada una de las dos dianas analizadas en este kit:

- PML-RARA Screening Master Mix: Oligonucleótidos y sonda de hidrólisis [FAMTM] específicos que permite detectar los reordenamientos bcr1, bcr2 y bcr3 de PML-RARA simultáneamente.
- GUS Master Mix: Oligonucleótidos y sonda de hidrólisis [FAMTM] específicos que permite detectar la presencia del gen de referencia GUS.
- Positive Control: Un control positivo de la translocación bcr1, bcr2, bcr3 y GUS.

Reactivos	Color	Viales	Conservación
PML-RARA Screening Master Mix	Disco morado	3 x 16 reacciones	4°C
GUS Master Mix	Disco amarillo	3 x 16 reacciones	4°C
Positive Control	Tapa morada	1 vial	4°C

Tabla 1. Componentes del kit imegen PML-RARA Screening.

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



imegen

6. Equipos, reactivos y materiales no suministrados

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real
- Micropipetas (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- Vortex

Reactivos:

- Agua libre de nucleasas
- Master Mix de PCR 2X (ADN Polimerasa HotStart)

NOTA: Además este kit no incluye los reactivos necesarios para llevar a cabo la retrotranscripción del ARN a cDNA.

Materiales:

- Tubos ópticos de 0.2 mL
- Tapas ópticas para tubos de 0.2 mL
- Puntas de pipetas con filtro (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Guantes de látex sin polvo

6.1 Kits complementarios

Si los resultados del screening de reordenamientos PML-RAR α resultan positivos para alguna de las muestras analizadas, imegen ofrece el kit Imegen PML-RARA [REF. IMG-111].

Este kit permite la cuantificación del transcrito de fusión de PML-RAR α más común: bcr1, el cual representa el 55% de los casos de Leucemia Promielocítica Aguda [LPA] con t(15;17)(q22q21).



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 4°C durante una hora antes de su uso.

Reactivos	Rehidratación
PML-RARA Screening Master Mix	90 µL de agua/vial
GUS Master Mix	90 µL de agua/vial
Positive 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 -20°C.

7.2 Preparación de las reacciones de amplificación

El protocolo de preparación de las reacciones se muestra a continuación:

1. Descongelar los reactivos necesarios para el análisis, incluyendo:
 - PML-RARA Screening Master Mix / GUS Master Mix
 - Positive Control
 - Muestras de cDNA sin diluir
 - Agua libre de nucleasas para el control de PCR [CPCR]
 - 2x HotStart DNA Polymerase [not provided]
2. Agitar en vortex a cada uno de los reactivos y mantener en frío.
3. Se deberán preparar máster mixes independientes para realizar el análisis del gen de referencia GUS y del oncogén PML-RARA. Para ello, se preparan máster mixes independientes en tubos de 1.5 mL de acuerdo con las siguientes tablas:

Master Mix PML-RARA [Oncogén]

Reactivos	Volumen por reacción
PML-RARA Screening Master Mix	5 µL
2x Hot Start DNA Polymerase	10 µL

Master Mix GUS [Gen endógeno]

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

Los volúmenes requeridos para cada mix deben ser calculados para el número total de muestras que se vayan a incluir en el estudio. Además, se debe de calcular un extra de reactivos para incluir los controles positivos y los controles de PCR (CPCR).

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 a los Mix de PCR y pipetear 15 µL en cada pocillo.
5. Una vez las mixes se hayan dispensado, añadir los siguientes volúmenes en los pocillos correspondientes:
 - 5 µL de la muestra de cDNA
 - 5 µL del Control PML-RARA [Control positivo]
 - 5 µL de agua libre de nucleasas [Control de PCR, CPCR]

PML-RARA Screening Master Mix		GUS Master mix	
cDNA muestra 1	Control Positivo	cDNA muestra 1	Control Positivo
cDNA muestra 2	CPCR	cDNA muestra 2	CPCR
cDNA muestra 3		cDNA muestra 3	
cDNA muestra 4		cDNA muestra 4	

Figura 1. Ejemplo de una posible disposición de la placa para la PCR a tiempo real.



imegen

7.3 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™: incluida
- Fluoróforos de las sondas TaqMan:

Sonda	Fluoróforo	Quencher
PML-RARA	FAM™	TAMRA
GUS	FAM™	TAMRA

Tabla 3. Información de las sondas.

*En the *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
Temperatura	50°C	95°C	95°C	Unión de cebadores / Extensión 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 (CPCR)

- Comprobar que en los controles negativos no hay amplificación. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el análisis para descartar que se haya producido una contaminación accidental.

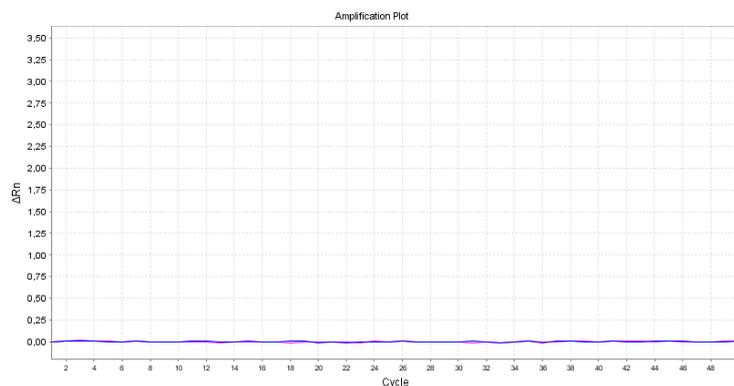


Figura 2. Resultado esperado para el control negativo (NTC)

CONTROL POSITIVO

- Comprobar que el control positivo se amplifica en las dos reacciones. En caso negativo, se recomienda repetir el análisis para descartar que se haya producido algún error en la preparación de las reacciones.

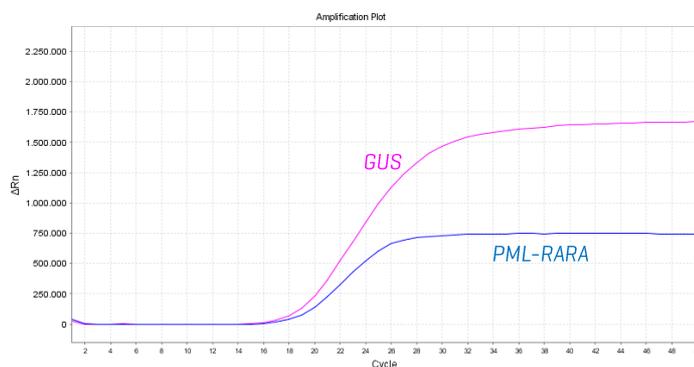


Figura 3. Resultado esperado para el control positivo.

MUESTRAS [cDNA]

GUS Master Mix

- Comprobar que se detecta el gen de referencia en todas las muestras analizadas con el GUS Master Mix. Esta reacción permite comprobar que en la muestra existe suficiente cantidad de cDNA y de una calidad apropiada.

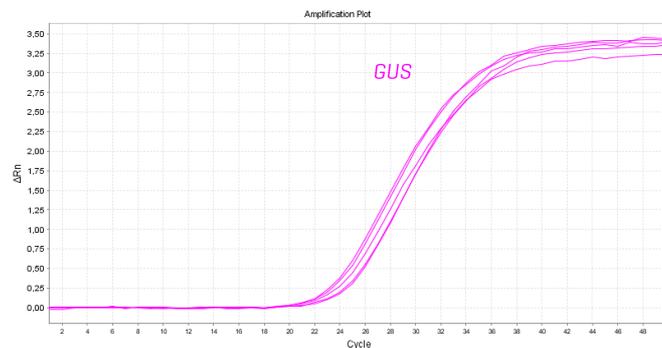


Figura 4. Resultado esperado con el sistema GUS para una muestra de cDNA de buena calidad.

PML-RARA Screening Master Mix & GUS Master Mix

- Tras la verificación de todos los controles, se analizará cada una de las muestras. La muestra posee el reordenamiento si se detecta amplificación con el BCR-ABL Master Mix.

Muestra negativa

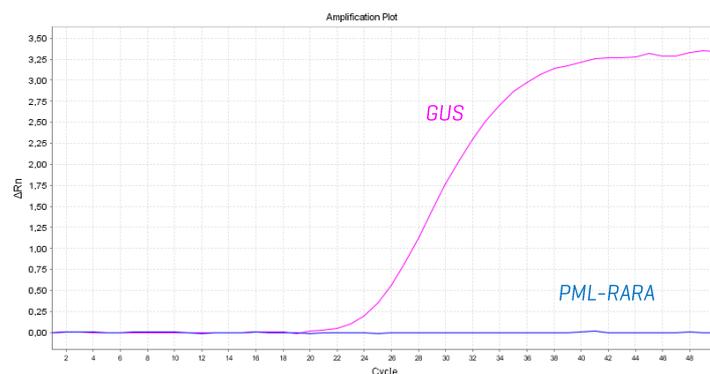


Figura 5. Resultado esperado en muestras de cDNA no patogénicas. El sistema GUS amplificará dicho gen, pero el sistema BCR Screening no amplificará el oncogen PML-RARA.

Muestra positiva

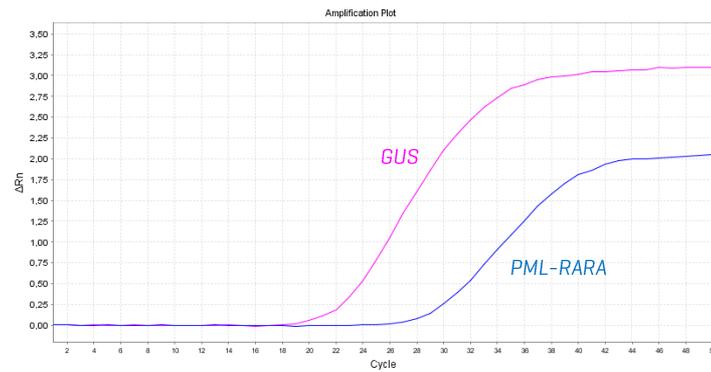


Figura 6. Resultado esperado en muestras de cDNA patogénicas. Ambos sistemas amplificarán sus dianas, tanto el gen GUS como el oncogen PML-RARA.

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:

Controles y muestras	PML-RARA	GUS	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 ADN humano o control positivo ³

Tabla 5. Interpretación de los posibles resultados del kit imegen PML-RARA Screening

- 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.



imegen

10. Limitaciones

10.1 Equipos

Imegen PML-RARA Screening ha sido validado con los siguientes equipos de PCR a tiempo real:

- StepOnePlus™ 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 PML-RARA Screening** 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.