

INSTRUCCIONES DE USO MYELOSCREEN

REF

MS-BA-P190/230-24

BCR- ABL DETECT P190/ P230 ONE STEP

KIT PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

INDICE

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS

2. USO PREVISTO

3. CONTENIDO

4. EQUIPAMIENTO NECESARIO

5. REACTIVOS NECESARIOS NO PROPORCIONADOS

6. PROTOCOLO

6.1. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE INTERÉS.

6.2. REACCIÓN DE “MARCADO” DE LOS AMPLICONES CON BARCODES Y RESTO DE SECUENCIAS PARA EL SISTEMA MISEQ.

7. RECOMENDACIONES PARA LA PREPARACIÓN MUESTRAS PARA SECUENCIACIÓN








8. RECOMENDACIONES TRABAJO CON PCR.

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS



Calle Catedrático
José Beltrán, Nº 2
CP 46980 Paterna

Valencia, España

	Marcado CE (Directiva Europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.		Temperatura de almacenamiento: -15/-25°C
	Fabricante		Estable hasta AAAA/MM/DD
	Referencia: Nº de catálogo		Consulte las instrucciones de uso
	Código del lote		



2. ANTECEDENTES Y USO PREVISTO

La presencia de la traslocación t(9;22) (q34;q11): implica una fusión del gen BCR en el cromosoma 22q11 con el gen ABL, localizado en 9q23. Esta fusión se conoce como *BCR-ABL*. Los puntos de traslocación pueden ocurrir en varias localizaciones, y en función de los puntos de rotura se pueden generar diferentes variantes. El gen de fusión BCR-ABL está presente en más del 95% de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) aparece también en un 25% de los casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA). Las diferentes variantes de traslocación varían en función de la neoplasia. En LMC, >95% de los pacientes presentan un transcrito de tipo e13a2 o e14a2, las cuales dan lugar a una proteína de 210-kDa (p210). Más del 50% de los pacientes con LLA de tipo BCR/ABL-positivo presentan la traslocación e1/a2, que genera una proteína de 190-kDa (p190), mientras la mayoría de los pacientes restantes tienen, bien la variante e13/a2 o la e14/a2. La variante p230 presenta un transcrito e19/a2 y, aunque es poco frecuente, es recomendable incluirla en los análisis.

Nuestros kits permiten identificar y distinguir las isoformas p190 (e1a2, e1a3) y la isoforma p230 (e19a2, e19a3).

PRINCIPIOS DEL TEST

El kit incluye reactivos para la amplificación y detección de las isoformas de BCR-ABL p190 (e1a2 y e1a3), p230 (e19a2) y los controles positivos para cada una de ellas mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO.

El kit BCR-ABL P190-P230 ONE-STEP es un nuevo diseño en multiplex que permite detectar simultáneamente las isoformas p190 (e1a2, e1a3) y p230 (e19a2, e19a3) mediante RT-qPCR en un solo paso. Además, las reacciones incluyen un control interno (detección de los niveles de ARNm del gen GUS) para cada una de las muestras, de manera que podemos analizar al mismo tiempo la calidad de la muestra y de la reacción de RT-PCR de manera individual. El kit incluye todos los reactivos requeridos para la síntesis de cDNA, la amplificación y detección por PCR a tiempo real, así como controles internos validados las isoformas descritas. El kit no incluye los componentes para aislar el RNA de sangre o de médula ósea.

El kit debe ser almacenado a -20 °C. Evitar ciclos de congelaciones/descongelaciones y proteger de la luz.

3. CONTENIDO

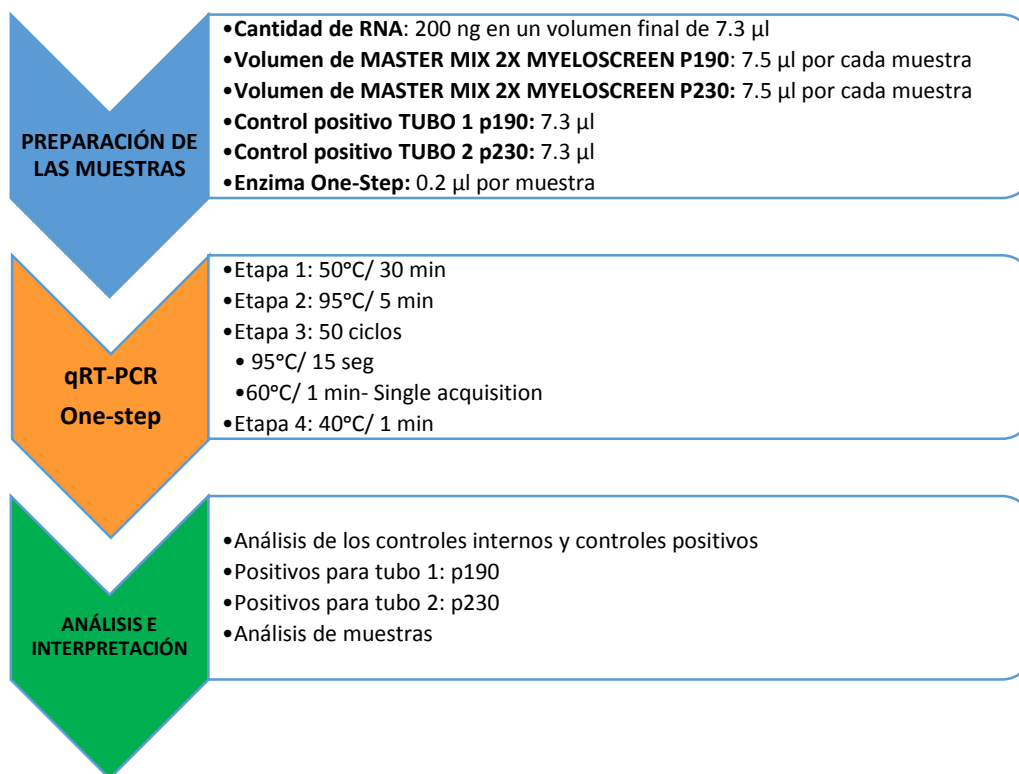
- Mastermix 2X MYELOSCREEN P190 (TUBO 1)
- Mastermix 2X MYELOSCREEN P230 (TUBO 2)
- Enzima One-Step
- CONTROL POSITIVO MYELOSCREEN P190 (CONTROL TUBO 1)
- CONTROL POSITIVO MYELOSCREEN P230 (CONTROL TUBO 2)

4. MATERIAL REQUERIDO NO PROPORCIONADO

- **Equipamiento:**
 - Equipo de qPCR LightCycler® 480 (Roche).
 - Cabina para PCR.
 - Pipetas para volúmenes entre 0.2, 20 y 200 µl (aconsejable una 0.5 a 10, otra de 2-20 y otra de 10-100 o hasta 200).
 - Centrífuga para tubos de 1.5 ml y placas multipocillo.
- **Consumibles**
 - Placas de 96 pocillos LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, White (Roche)
 - Films adhesivos para placas de 96 pocillos aptas para qPCR.
 - Puntas con filtro libres de DNAsas y RNAsas.
 - Agua miliQ libre de RNAsas.

- Guantes.

VISTA GENERAL DEL PROTOCOLO



PROTOCOLO MYELOSCREEN BCR-ABL P190-P230

Notas:

- Tomar las precauciones requeridas para manipular RNA y material pre-PCR.
- Antes de empezar las reacciones agitar mediante vórtex y centrifugar previamente a abrir los tubos.

Protocolo:

1. Preparar el q-RT-PCR master mix en un tubo de microcentrífuga libre de RNAsas, siguiendo las cantidades descritas en la tabla 1. Añadir los reactivos al tubo. El mix se prepara en un tubo para p190 y en otro tubo diferente para p230. Los volúmenes indicados son por reacción. Para preparar el premix se recomienda multiplicar los volúmenes indicados por el número de muestras, con un exceso del 10% del volumen total.
2. Alicuotar 7.7 µl de la mezcla de reacción a cada uno de los pocillos de la placa de 96.
3. Añadir 200 ng de RNA total al mix y completar hasta tener 15 µl de volumen total por pocillo con agua miliQ libre de RNAsa el RNA de las muestras problema, de manera que tengamos 200 ng de RNA total en un volumen final de 15 µl (el rango de trabajo puede ser entre 10 y 500 ng de ARN por reacción, siendo la cantidad ideal de 200 ng por reacción).
4. Añadir 7.3 µl de la muestra a los pocillos del TUBO1 (P190) y a los del TUBO 2 (p230)
5. Añadir 7.3 µl del control positivo del tubo 1 (P190) y del control positivo del tubo 2 (p230) a los pocillos control.
6. Sellar la placa con el film adhesivo.
7. Centrifugar la placa durante 10 segundos e insertarla en el instrumento de qPCR

Tabla 1: Preparación del premix

Descripción	Volumen (µl) 1 muestra	Volumen (µl) 5 muestras	Descripción	Volumen (µl) 1 muestra	Volumen (µl) 5 muestras
TUBO 1 MasterMix 2x Myeloscreen P190	7.5	38.25	TUBO 2 MasterMix 2x Myeloscreen P230	7.5	38.25
Enzima One-step	0.2	1.02	Enzima One-step	0.2	1.02

Sugerencia de distribución de la placa

	Columna tubo 1 P190	Columna tubo 2 P230										
A	Muestra 1	Muestra 1										
B	Muestra 1	Muestra 1										
C	Muestra 2	Muestra 2										
D	Muestra 2	Muestra 2										
E	blanco	blanco										
F	blanco	blanco										
G	Positivo P190	Positivo P230										
H	Positivo P190	Positivo P230										

Programación de adquisición LightCycler® 480:

- Detection Format: 3 Color Hydrolysis Probe
- Filter:
 - FAM (Fluorescencia 465-510)
 - VIC/HEX/Yellow555 (Fluorescencia 533-580)
 - Cy5/Cy5.5 (Fluorescencia 618-660)
- Reaction Volume: 15 µl

Programa One-Step

Target(°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate(°C/S)	Cycles
50°C	None	00:30:00	4.40	1
95°C	None	00:05:00	4.40	1
95°C	None	00:00:15	4.40	50
60°C	Single	00:01:00	2.20	
40°C	None	00:01:00	2.20	1

ANÁLISIS DE DATOS E INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO

1. Chequear que la señal Cy5 esté presente en todas las muestras. El valor de Cq de esta señal debe de ser inferior a 35. Si es superior a 35 la muestra no se puede analizar y se recomienda repetir el ensayo aumentando la cantidad de RNA.
2. Muestras analizadas con tubo 1 (MasterMix 2x Myeloscreen P190):
 - a. Valores positivos para canal FAM (Cq≤35): p190 e1a2
 - b. Valores positivos para canales FAM y HEX (Cq≤35): p190 e1a2
 - c. Valores positivos para HEX (Cq≤35) y negativo para FAM (C>35): p190 e1a3
3. Muestras analizadas con tubo 2 (MasterMix 2x Myeloscreen P230):
 - a. Valores positivos para FAM y/o HEX (Cq≤35): p230 e19a2

Nota: Los valores de Cq no deben de ser utilizados para la cuantificación exacta de los transcritos de fusión. Hay que hacer un ensayo de cuantificación para la isoforma detectada con los estándares correspondientes. ESTE KIT PARA USO CUALITATIVO.

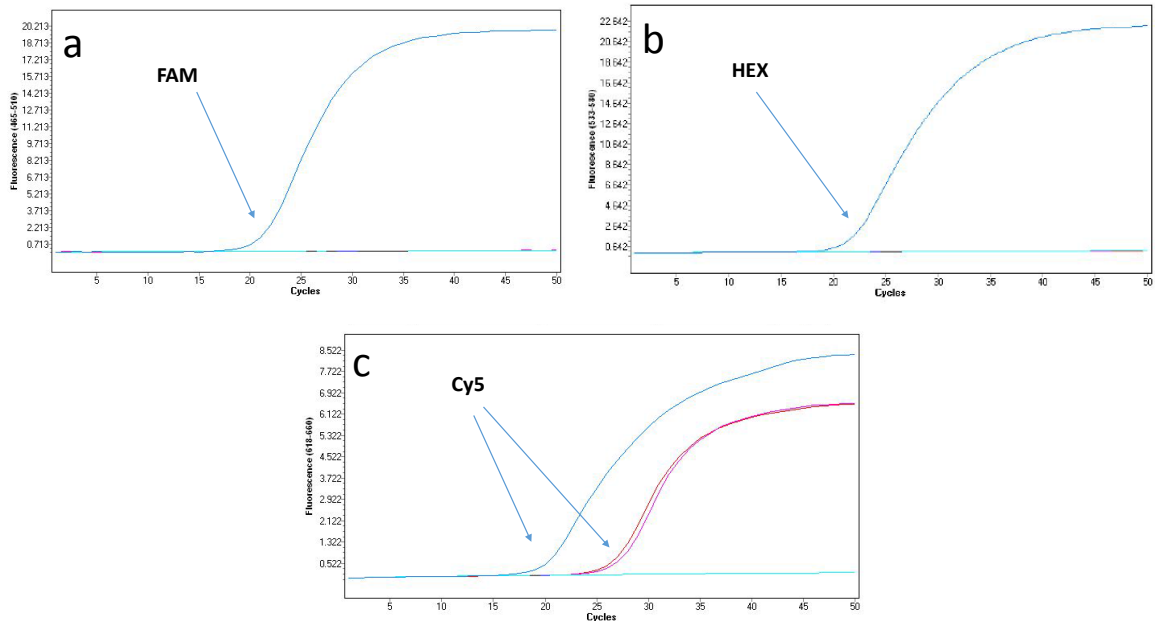


Fig 1: Ejemplo de gráficos de amplificación para el test Myeloscreen BCR-ABL P190-P230. La imagen muestra el resultado de la amplificación de 3 muestras problema y un control negativo para las isoformas P190 de BCR-ABL (TUBO 1). Amplificación de la sonda FAM (a), sonda HEX (b) y sonda Cy5 (c). Este ejemplo sería positivo para la isoforma P190 (e1a2)

- La curva de amplificación de Cy5 (Fluorescence 618-660nm) muestra la amplificación del gen de referencia GUSB. Es un control positivo tanto de la calidad del RNA como del correcto funcionamiento de la RT y de la qPCR.
- La curva de amplificación de FAM (Fluorescence 465-510nm) muestra la amplificación de la isoforma P190 (e1a2) en el caso de tubo 1 MasterMix 2x Myeloscreen P190 y de la isoforma P230 (e19a2) en el caso de tubo 2 (MasterMix 2x Myeloscreen P230).
- La curva de amplificación de HEX (Fluorescence 533-580nm) muestra la amplificación de la isoforma P190 (e1a2 ó e1a3) en el caso de tubo 1 MasterMix 2x Myeloscreen P190 y de la isoforma p230 (e19a2) en el caso de tubo 2 (MasterMix 2x Myeloscreen P230).

Referencias

1. Luu MH and Press RD. BCR-ABL PCR testing in chronic myelogenous leukemia: molecular diagnosis for targeted cancer therapy and monitoring. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2013;13:749-762.
2. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 2003;17 (12):2318-2357.