

Instrucciones de uso

CE IVD

IdentiClone® *BCL1/J_H* Translocation Assay

Para la identificación del linfoma de células del manto y otros linfomas y leucemias.

IVD Para uso diagnóstico *in vitro*



🔑 Condiciones de conservación: de **-85°C a -65°C**

(Los controles de ADN pueden separarse de los kits de prueba y conservarse entre 2°C y 8°C)

Núm. de catálogo	Productos	Cantidad
REF 93080010	IdentiClone <i>BCL1/J_H</i> Translocation Assay – Gel Detection	33 reacciones
REF 93080020	IdentiClone <i>BCL1/J_H</i> Translocation Assay MegaKit – Gel Detection	330 reacciones

Índice

1.	USO PREVISTO	3
2.	RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA.....	3
2.1.	Antecedentes	3
2.1.	Descripción general	3
3.	PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO	4
3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	4
3.2.	Detección en gel.....	4
4.	REACTIVOS	5
4.1.	Componentes del reactivo.....	5
4.2.	Advertencias y precauciones.....	5
4.3.	Conservación y manipulación.....	6
5.	INSTRUMENTAL.....	6
5.1.	Termociclador.....	6
5.2.	Unidad de electroforesis.....	6
5.3.	Unidad de iluminación UV	6
6.	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	7
6.1.	Precauciones.....	7
6.2.	Sustancias interferentes.....	7
6.3.	Requisitos y manipulación de las muestras.....	7
6.4.	Preparación de las muestras	7
6.5.	Conservación de las muestras	7
7.	PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA	8
7.1.	Materiales suministrados	8
7.2.	Materiales necesarios (no suministrados)	8
7.3.	Preparación de los reactivos	9
7.4.	Amplificación	10
7.5.	Detección en gel – Geles de agarosa TBE	10
7.6.	Control de calidad	11
7.7.	Controles positivos recomendados	11
8.	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	12
8.1.	Análisis	12
8.2.	Interpretación de la muestra.....	12
9.	LIMITACIONES DE PROCEDIMIENTO.....	13
10.	VALORES PREVISTOS	13
10.1.	Tamaño previsto de los productos amplificados.....	13
10.2.	Datos de la muestra	13
11.	EFICACIA DIAGNÓSTICA	14
12.	BIBLIOGRAFÍA	14
13.	SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE.....	14
14.	SÍMBOLOS	15
15.	AVISO LEGAL.....	15
15.1.	Garantía y responsabilidad	15
15.2.	Patentes y marcas registradas.....	15
15.3.	Aviso para el comprador: SOLO para DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq	15

1. Uso previsto

La IdentiClone *BCL1/J_H* Translocation Assay es un producto de diagnóstico *in vitro* diseñado para la detección mediante PCR de las translocaciones de genes *BCL1/J_H* t(11;14)(q13;q32) en pacientes con sospecha de trastornos linfoproliferativos, y sirve específicamente para:

- Identificar las translocaciones de genes *BCL1/J_H* con una gran sospecha de linfoma de células del manto.
- Distinguir el linfoma de células del manto de otras proliferaciones neoplásicas o benignas de linfocitos B.
- Controlar y evaluar las recidivas de la enfermedad.

2. Resumen y explicación de la prueba

2.1. Antecedentes

La translocación de genes *BCL1/J_H* (11;14) (q13;q32) se encuentra principalmente en el linfoma de células del manto (LCM) (50-70 %), pero también se observa en la leucemia prolinfocítica B (LPL-B) (10-20 %), leucemia de células plasmáticas (LCP), linfoma esplénico con linfocitos vellosos (LELV), leucemia linfocítica crónica (LLC) (2-5 %) y en el mieloma múltiple (MM) (20-25 %)¹. La hibridación fluorescente in situ (FISH) con sondas que flanquean la región del conglomerado del punto de ruptura de la translocación de *BCL1/J_H* (Bcr) en la banda q13 del cromosoma 11 reveló que todos los linfomas de células del manto (según lo definido por la clasificación REAL) llevan la t(11;14)(q13;q32)²,³. Los puntos de ruptura de *BCL1/J_H* están dispersos en una región de 350 kilobases (kb), y aproximadamente el 41 % de estos puntos de ruptura se agrupan en un locus de solo 1 kb conocido como el grupo de translocación principal (MTC) de *BCL1*³. Los puntos de ruptura de *BCL1/J_H* agrupados en el locus *BCL1-MTC* de 1 kb pueden detectarse mediante la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta translocación genética aberrante yuxtapone genes de la región de unión (*J_H*) de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGH*) en el cromosoma 14q32 con el gen de ciclina D1 en el cromosoma 11q13. La yuxtaposición de las secuencias *IGH J_H* da como resultado la activación transcripcional de la ciclina D1, que participa en la regulación de la progresión de G1 y la transición de G1/S del ciclo celular⁴,⁵. La translocación no da lugar a la expresión de una proteína de fusión; de hecho, la oncogénesis se debe a un intercambio promotor/intensificador, en el que el intensificador del gen de la inmunoglobulina estimula la expresión de la ciclina D1. La sobreexpresión de la ciclina D1, a su vez, acelera el paso de células transformadas a través de la fase G1. La clasificación revisada de la OMS incluye la presencia de t(11;14)(q13;q32) y/o la sobreexpresión de la ciclina D1 como una de las características del linfoma de células del manto.

Esta prueba es más útil cuando se enfrenta a un diagnóstico diferencial difícil que incluye el LCM. Por ejemplo, una proliferación neoplásica de linfocitos B en tejido, sangre o médula ósea que es difícil de clasificar como LLC, linfoma folicular (LF), linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas o LCM puede clasificarse fácilmente como este último si se detecta una translocación de los genes *BCL1/J_H*. Esto tiene importantes implicaciones clínicas, ya que los linfomas de células del manto suelen ser más agresivos y, en general, tienen un peor pronóstico que otros linfomas de linfocitos B de bajo grado. Dado que esta anomalía molecular también es un marcador específico del tumor, se puede utilizar con fines de estadificación y para controlar a los pacientes en busca de recaídas de la enfermedad después del tratamiento, si se estudió su linfoma original y se demostró que tiene un reordenamiento de los genes *BCL1/J_H*.

2.1. Descripción general

Las pruebas IdentiClone de Invivoscribe representan un nuevo enfoque para las pruebas de clonalidad mediante PCR. Estas pruebas estandarizadas se han optimizado minuciosamente mediante el análisis de muestras de control positivo y negativo con distintas mezclas de reacción. Tras el desarrollo de la prueba se completó una importante fase de validación, que incluyó el análisis de más de 400 muestras clínicas de acuerdo con la clasificación Revised European/American Lymphoma (REAL). Este análisis se realizó en más de treinta conocidos centros de análisis de toda Europa, como parte de un estudio colaborativo denominado BIOMED-2 Concerted Action.⁶

Las pruebas de detección en gel no detectan de forma fiable aquellas poblaciones clonales que representan menos del 0,1 % de la población de linfocitos total. **Los resultados de las pruebas de clonalidad molecular siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.**

Este kit de prueba incluye dos (2) mezclas de reacción. La mezcla de reacción *BCL1/J_H* se dirige al conglomerado de translocación principal (MTC) del locus *BCL1* y a la región de unión del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina. La otra mezcla de reacción, la Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño) se dirige a distintos genes para generar una serie de amplicones de aproximadamente 100, 200, 300, 400 y 600 pares de bases (pb) y garantizar que la calidad y la cantidad

de ADN sean suficientes para que el resultado sea válido. En muchas de nuestras pruebas se usa un único programa del termociclador y un método de detección similar, lo que aumenta la uniformidad y facilita la formación cruzada en una amplia variedad de pruebas.

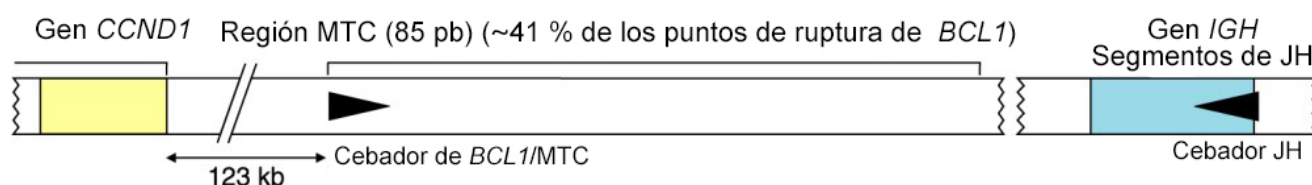
Esta prueba se basa en EuroClonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.



3. Principios del procedimiento

3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las pruebas de PCR se utilizan habitualmente para la identificación de translocaciones cromosómicas. Esta prueba se dirige a la región MTC de la translocación *BCL1/JH* y amplifica el ADN genómico situado entre los cebadores que se dirigen al gen *BCL1* y las regiones conservadas de unión (*JH*) del gen *IGH* (mezcla de reacción *BCL1/JH* Tube). **Los puntos de ruptura que ocurren fuera del MTC no serán identificados por esta prueba en particular.** Por lo tanto, un resultado negativo no excluye completamente la presencia de un reordenamiento genético *BCL1/JH* en la muestra.⁶ El ADN de una población normal de linfocitos también arrojará un resultado negativo.



Tubo t(11;14): 1 cebador *BCL1* MTC + 1 cebador *JH*

Figura 1. Representación de un diagrama esquemático de la translocación *BCL1/JH* t(11;14) que muestra el gen de la ciclina D1 (*CCND1*) a la izquierda y el gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGH*) a la derecha. Se muestran las posiciones y orientaciones relativas del cebador *BCL1/MTC* y el cebador de *JH*, que se incluyen en la mezcla de reacción *BCL1/JH* Tube.

3.2. Detección en gel

La electroforesis en gel, como la electroforesis en gel de agarosa o la electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante (PAGE), se usa habitualmente para resolver los diferentes productos del amplicón en función de su tamaño, carga y conformación. Dado que el ADN está cargado negativamente, cuando se ejerce un potencial eléctrico (voltaje) a través del gel que contiene los productos de la PCR, el campo eléctrico hace que los amplicones se desplacen a través del gel. Los fragmentos de ADN más pequeños pueden desplazarse fácilmente a través de la matriz del gel, mientras que los fragmentos más grandes lo hacen más lentamente, lo que da lugar a la separación de los productos del amplicón en función del tamaño. A continuación se puede usar bromuro de etidio u otros colorantes por intercalación del ADN para teñir y detectar estos productos en el gel.

4. Reactivos

4.1. Componentes del reactivo

Tabla 1: Pruebas disponibles

Número de catálogo	Descripción	Cantidad
REF 93080010	IdentiClone <i>BCL1/J_H</i> Translocation Assay – Gel Detection	33 reacciones
REF 93080020	IdentiClone <i>BCL1/J_H</i> Translocation Assay MegaKit – Gel Detection	330 reacciones

Tabla 2: Componentes del kit

Reactivo	Número de catálogo (REF)	Componentes de los reactivos (principios activos)	Cantidad por unidad	93080010 Número de unidades	93080020 Número de unidades	Temp. de conservación
Mezcla de reacción	21010010CE	<i>BCL1/J_H</i> Tube – Unlabeled (Tubo de <i>BCL1/J_H</i> - Sin marcar) Distintos oligonucleótidos que se dirigen al MTC del gen <i>BCL1</i> y la región J del gen <i>IGH</i> en solución salina tamponada.	1500 µL	1	10	 -85°C -65°C
Mezcla de reacción de control de amplificación del molde	20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (Control de la muestra con marcador de tamaño, sin marcar) Distintos oligonucleótidos dirigidos a genes de mantenimiento.	1500 µL	1	10	
ADN de control positivo	40880550	IVS-0010 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0010) 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	 2°C 8°C
ADN de control negativo (normal)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de control policlonal IVS-0000) 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	 -85°C -65°C

Nota: No se han utilizado conservantes en la fabricación de este kit.

4.2. Advertencias y precauciones

- **IVD** Este producto es para uso diagnóstico *in vitro*.
- Utilice este kit de prueba a modo de sistema. No utilice reactivos de otros fabricantes. Cualquier alteración del protocolo — como la realización de diluciones o reducciones de las reacciones de amplificación— puede afectar al rendimiento de la prueba e implicar la anulación de cualquier garantía derivada de la adquisición de estos kits.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada si se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- El cumplimiento del protocolo garantiza un rendimiento y una reproducibilidad óptimos. Asegúrese de usar el programa adecuado del thermal cycler, ya que, si usa otros programas, los resultados serán imprecisos o erróneos y darán lugar a falsos positivos y falsos negativos.
- No mezcle ni combine reactivos de kits con diferentes números de lote.
- Utilice equipos de protección individual estándar, siga las prácticas óptimas de laboratorio y tome las precauciones necesarias cuando trabaje con muestras. Manipule las muestras en instalaciones aprobadas de contención de seguridad biológica y ábralas solo en campanas de seguridad biológica certificadas. Emplee agua para uso en biología molecular a la hora de preparar el ADN de la muestra.
- Dado que se trata de una prueba de sensibilidad analítica, debe ser extremadamente cauteloso para evitar la contaminación de los reactivos o mezclas de amplificación con muestras, controles o material amplificado. Todos los reactivos deben controlarse estrechamente para detectar signos de contaminación (*p. ej.*, controles negativos que den señales positivas). Elimine cualquier reactivo que pueda haberse contaminado.
- Para reducir al mínimo la contaminación, use guantes limpios cuando manipule muestras y reactivos y limpie de manera regular las zonas de trabajo y las pipetas antes de realizar pruebas por PCR.
- El autoclave no elimina la contaminación del ADN. En el laboratorio de PCR, siga una secuencia de trabajo unidireccional entre las distintas zonas de trabajo: comience con la preparación de mezclas de reacción, continúe con la preparación de las muestras, luego con la amplificación y, finalmente, con la detección. No lleve ADN amplificado a las zonas designadas para la preparación de mezclas de reacción o de muestras.
- Las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica del laboratorio deben ser de uso exclusivo de dicha zona.
- Siempre que sea posible, utilice material plástico estéril desechable para evitar la contaminación con RNasa y DNasa o la contaminación cruzada.

4.3. Conservación y manipulación

- Si no va a hacer un uso inmediato de los kits de prueba, **consérvelos a entre -85°C y -65°C .**
- La temperatura de conservación óptima para los controles de ADN es de entre 2°C y 8°C , pero los controles de ADN pueden conservarse a entre -85°C y -65°C .
- Tanto los reactivos como el material de referencia deben descongelarse y mezclarse en un agitador vorticial antes de usarse para garantizar la resuspensión. Una agitación vorticial excesiva puede dañar el ADN y hacer que los cebadores marcados pierdan sus fluoróforos.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada si se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de su fecha de caducidad.
- Debido a las altas concentraciones de sal, las mezclas de reacción de PCR son sensibles a los ciclos de congelación/descongelación. Vierta las mezclas de reacción en tubos estériles con cierre roscado y junta tórica si es necesario.

5. Instrumental

5.1. Termociclador

- Uso o función: amplificación de muestras de ADN.
- Eficacia diagnóstica y especificación:
 - Intervalo térmico mínimo: de 15°C a 96°C .
 - Velocidad mínima de rampa: $0,8^{\circ}\text{C/s}$
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante.
- Consulte el apartado 7.4, *Amplificación*, para conocer el programa del termociclador.

5.2. Unidad de electroforesis

- Uso o función: separación de fragmentos de ADN.
- Eficacia diagnóstica y especificación:
 - Capacidad para funcionar a 35-135 V durante períodos prolongados.
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante

5.3. Unidad de iluminación UV

- Uso o función: detección de ADN.
- Eficacia diagnóstica y especificación:
 - Capacidad para emitir luz a una longitud de onda aproximada de 302 nm.
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante

6. Recogida y preparación de las muestras

6.1. Precauciones

Las muestras biológicas procedentes de seres humanos pueden contener materiales posiblemente infecciosos. Manipule las muestras de acuerdo con la norma de la OSHA sobre patógenos de transmisión hemática y de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2.

6.2. Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias pueden interferir con la PCR:

- Quelantes de cationes divalentes.
- Puntas de pipeta de baja retención.
- EDTA (no significativo en concentraciones bajas).
- Heparina.

6.3. Requisitos y manipulación de las muestras

Con este kit, puede analizarse **ADN genómico** (ADNg) con los siguientes orígenes:

- 5 cc de sangre periférica, biopsia de médula ósea o aspirado de médula ósea anticoagulado con heparina o EDTA (conservados a entre 2°C y 8°C y transportados a temperatura ambiente).
- 5 mm cúbicos como mínimo de tejido (conservados y enviados congelados o conservados y enviados en RPMI 1640 a temperatura ambiente o en hielo).
- 2 µg de ADN genómico (conservado a entre 2°C y 8°C y enviados a temperatura ambiente).
- Tejido o cortes fijados en formol e incluidos en parafina (conservados y enviados a temperatura ambiente).

6.4. Preparación de las muestras

Extraiga el ADN genómico de las muestras de los pacientes lo antes posible. Vuelva a suspender el ADN en concentraciones finales de entre 100 µg y 400 µg por mL en solución TE 1/10 (1 mM de Tris-HCl, pH 8,0 y 0,1 mM de EDTA) o en agua para uso en biología molecular o que reúna las condiciones de la USP. Este es un sistema de pruebas sólido. Los resultados válidos derivan de un amplio abanico de concentraciones de ADN. Por lo tanto, no suele ser necesario cuantificar y ajustar las concentraciones de ADN. Analizar el ADN de la muestra con la Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño) garantizará que la calidad y la cantidad del ADN sean suficientes para que el resultado sea válido.

6.5. Conservación de las muestras

Conserve el ADNg de 2°C a 8°C o de -85°C a -65°C si la conservación se hará a largo plazo.

7. Procedimiento de la prueba

7.1. Materiales suministrados

Tabla 3: Componentes del kit

Número de catálogo	Descripción
REF 23080010CE	BCL1/J _H Tube – Unlabeled (Tubo de BCL1/J _H - Sin marcar)
REF 20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (Control de la muestra con marcador de tamaño - Sin marcar)
REF 40880550	IVS-0010 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0010)
REF 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de control policlonal IVS-0000)

7.2. Materiales necesarios (no suministrados)

Tabla 4: Materiales necesarios (no suministrados)

Reactivo/material	Reactivos o material recomendado y proveedor	Número de catálogo	Notas
ADN polimerasa	Roche: - DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq Invivoscribe, Inc.: - DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq¹ o equivalente	05206944190 60970100	N. P.
Agua para uso en biología molecular o que reúna las condiciones de la USP desionizada y destilada en vidrio	N. P.	N. P.	Estéril y exenta de DNasa y RNasa.
Pipetas calibradas	Rainin: - Pipetas P-2, P-20, P-200 y P-1000 - O pipetas SL-2, SL-20, SL-200 y SL-1000	N. P.	Deben ser capaces de medir con precisión volúmenes de entre 1 µL y 1000 µL.
Termociclador	Thermo Fisher Scientific: - Veriti Dx Thermal Cycler (termociclador Veriti Dx) Bio-Rad: - MJ Research PTC-100 o PTC-200, PTC-220, PTC-240	N. P.	N. P.
Agitador vortex	N. P.	N. P.	N. P.
Placas o tubos para PCR	N. P.	N. P.	Estériles
Puntas de pipeta con barrera de filtro	N. P.	N. P.	Estériles y exentas de RNasa, DNasa y pirógenos
Tubos de microcentrífuga	N. P.	N. P.	Estériles
Unidad de electroforesis en gel	N. P.	N. P.	Para geles de agarosa
Bromuro de etidio	Thermo Fisher Scientific: Ethidium Bromide (bromuro de etidio, EtBr) UltraPure™ 10 mg/mL	15585-011	N. P.
Agarosa	Thermo Fisher Scientific: - Agarosa MetaPhor™ - Agarosa NuSieve™ 3:1	50180 50090	N. P.
Amortiguador TBE de migración	Thermo Fisher Scientific: Novex TBE Running Buffer (5X) (Amortiguador TBE de migración Novex [5X])	LC6675	Diluir en 1:5 antes de usar.

Tabla 4: Materiales necesarios (no suministrados)

Reactivo/material	Reactivos o material recomendado y proveedor	Número de catálogo	Notas
Amortiguador de carga de gel	Thermo Fisher Scientific: 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Amortiguador de carga de gel 10X BlueJuice™) - Novex Hi-Density TBE Sample Buffer (5X) (Amortiguador TBE de muestra de alta densidad Novex [5X])	10816-015 LC6678	N. P.
100 bp DNA Ladder (Marcador de ADN de 100 pb)	Thermo Fisher Scientific: 100 bp DNA Ladder (marcador de ADN de 100 pb) TrackIt™	10488-058	N. P.

¹**Nota:** Este producto está a la venta únicamente para su uso en el Espacio Económico Europeo. No debe revenderse ni transferirse a terceros. Consulte también el Aviso legal en el apartado 15.

7.3. Preparación de los reactivos

- Analice todas las muestras desconocidas usando la mezcla de reacción Specimen Control Size Ladder para garantizar la ausencia de inhibidores de la amplificación y la presencia de la cantidad y la calidad necesarias del ADN para generar un resultado válido.
- Los resultados de las pruebas realizadas una sola vez son válidos. No obstante, analice **por duplicado** siempre que sea posible. Si los análisis por duplicado arrojan resultados incoherentes, puede ser necesario realizar un nuevo análisis de la muestra.
- Analice los controles **positivos, negativos y sin molde** de cada mezcla de reacción.

7.3.1. Póngase los guantes para sacar las mezclas de reacción del congelador. Deje que los tubos se descongelen. A continuación, mezcle con el agitador vorticial.

7.3.2. Encienda la campana de extracción o la cabina para PCR y pipetee una parte de cada mezcla de reacción a los tubos para microcentrifuga, que deberán estar esterilizados y limpios.

- Volúmenes de las partes: 45 µL por reacción.
- Añada una reacción adicional por cada 15 reacciones para corregir errores de pipeteo.
- Para cada mezcla de reacción (excepto para la Specimen Control Size Ladder), el número de reacciones (**n**) es:

n = 2 × n.º de muestras	(analice las muestras por duplicado)
+ 1	ADN de control positivo (consulte el apartado 7.7, <i>Controles positivos recomendados</i>)
+ 1	ADN de control negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Control sin molde (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo
n = 2 × n.º de muestras + 4	Total

- Por lo tanto, el volumen total de la parte para cada mezcla de reacción = **n × 45 µL**.
- Para la mezcla de reacción Specimen Control Size Ladder, el número de reacciones (**m**) es:

m = n.º de muestras	(analice las muestras por duplicado)
+ 1	ADN de control positivo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Control sin molde (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo
m = n.º de muestras + 3	Total

- Por lo tanto, el volumen total de la parte de la Specimen Control Size Ladder es **m × 45 µL**.

7.3.3. Añada 1,25 unidades (o 0,25 µL a 5 U/µL) de ADN polimerasa Taq por reacción a cada mezcla de reacción.

- La ADN polimerasa Taq total pipeteada a cada mezcla de reacción es **n × 0,25 µL** y **m × 0,25 µL** para la Specimen Control Size Ladder Master Mix.
- Mezcle suavemente en el agitador vortex.

- 7.3.4. Por cada reacción, vierta 45 µL de la mezcla de reacción que corresponda + la solución de ADN polimerasa en los pocillos de una placa o un tubo para PCR.
- 7.3.5. Añada 5 µL del molde que corresponda (ADN de muestra, ADN de control positivo, ADN de control negativo o agua) a los pocillos individuales que contengan las mezclas de reacción respectivas.
- Pipetee arriba y abajo varias veces para mezclar.
- 7.3.6. Tape o cubra la placa para PCR.
- Las muestras estarán listas para su amplificación en un termociclador.
 - Si la amplificación no puede realizarse inmediatamente después de la preparación de los reactivos, las placas o tubos para PCR pueden conservarse a entre 2°C y 8°C durante 24 horas como máximo.

Guía rápida:Por cada mezcla de reacción y n de reacciones, mezcle:**n × 45 µL** Mezcla de reacción**n × 0,25 µL** ADN polimerasa Taq

Mezcle suavemente en el agitador vorticial.

Pipetee **45 µL** de la mezcla de reacción + la solución de ADN polimerasa en cada pocillo de reacciónPipetee **5 µL** del molde que corresponda en cada pocillo.Volumen total de la reacción = **50 µL****7.4. Amplificación**

- 7.4.1. Amplifique las muestras mediante el siguiente programa de PCR:
- Seleccione la opción de medición de la temperatura **indicada** en los termocicladores BioRad MJ Research PTC.

Tabla 5: Condiciones del termociclador

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
1	95°C	7 minutos	1
2	95°C	45 segundos	35
3	60°C	45 segundos	
4	72°C	90 segundos	
5	72°C	10 minutos	1
6	15°C	∞	1

- 7.4.2. Extraiga la placa o los tubos de amplificación del termociclador.
- Aunque el ADN amplificado sea estable a temperatura ambiente durante largos períodos, conserve los productos de la PCR a entre 2°C y 8°C hasta la detección.
 - La detección debe realizarse en los 30 días posteriores a la amplificación.

7.5. Detección en gel – Geles de agarosa TBE

- 7.5.1. Prepare un gel de agarosa MetaPhor o NuSieve 3:1 al 2 %/gel TBE 1X.
- 7.5.2. Coloque el gel en la unidad de electroforesis y cúbralo con tampón TBE 1X.
- 7.5.3. Mezcle 20 µL de cada producto de PCR con 4 µL de tampón de carga de gel 6X.
- 7.5.4. Cargue 20 µL de esta mezcla en pocillos independientes del gel y cargue 4µL del 100 bp DNA ladder (marcador de ADN de 100 pb) que flanquea las muestras.
- 7.5.5. Procese a 100 V durante 90 minutos.
- El voltaje y el tiempo de electroforesis dependen del tamaño del amplicón de PCR, la longitud del gel y el porcentaje de agarosa del gel.
 - El voltaje y el tiempo de análisis se pueden adaptar en consecuencia.
- 7.5.6. Tiña el gel con bromuro de etidio u otro colorante equivalente.
- 7.5.7. Coloque el gel sobre el iluminador UV para ver las bandas.
- 7.5.8. Fotografíe e interprete los datos resultantes. (Consulte los apartados 8, *Interpretación de los resultados*, y 10, *Valores previstos*).

7.6. Control de calidad

Con el kit se suministran controles positivos y negativos (o normales); estos pueden desarrollarse una sola vez cada vez que se realiza la prueba, a fin de garantizar la realización adecuada. También debe desarrollarse un control sin molde (p. ej., agua) para saber si la mezcla de reacción se ha contaminado y si existe contaminación cruzada en las reacciones PCR. Por otro lado, debe incluirse un control de la solución amortiguadora para garantizar que la solución amortiguadora no esté contaminada. Los valores de los controles positivos figuran en el apartado 10.1, *Tamaño previsto de los productos amplificados*. Invivoscribe ofrece controles adicionales y controles de sensibilidad (diluciones de controles positivos en el control negativo).

7.7. Controles positivos recomendados

- Los tamaños del amplicón indicados se determinaron utilizando una plataforma ABI o mediante electroforesis en gel.

Tabla 6: Controles positivos recomendados

Mezcla de reacción	Diana	ADN de control	Número de catálogo	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
<i>BCL1/J_H</i> Tube	MTC de <i>BCL1/J_H</i>	Intervalo de tamaños válidos IVS-0010 Clonal Control DNA	--- 40880550	150 – 2000^a 202, ~600 ^b
Specimen Control Size Ladder	Distintos genes	Intervalo de tamaños válidos IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	100, 200, 300, 400, 600^c 100, 200, 300, 400, 600 ^c

^a**Nota:** En condiciones subóptimas, se puede observar una banda inespecífica débil de ~550 pb. Para discriminar entre productos específicos e inespecíficos, verifique que el control negativo no genere esta banda; si está presente en el control negativo, el producto es inespecífico.

^b**Nota:** El producto de PCR de ~600 pb es inespecífico.

^c**Nota:** Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb presente una menor señal o esté completamente ausente.

8. Interpretación de los resultados

A pesar de que un resultado positivo podría ser indicativo de neoplasia maligna, interprete los resultados tanto positivos como negativos teniendo en cuenta los datos clínicos y los resultados de los análisis. El intervalo de tamaños de cada mezcla de reacción se ha determinado mediante el análisis de las muestras de control positivo y negativo. Para que la interpretación sea precisa y significativa, deben descartarse los picos que no se ajusten al intervalo de tamaños válidos para cada una de las mezclas de reacción.

8.1. Análisis

- 8.1.1. Indique lo siguiente para las muestras que no consiga amplificar tras repetir el análisis: **“Se desconoce la naturaleza de la muestra porque la cantidad o la calidad del ADN eran insuficientes para su análisis”**.
- 8.1.2. Las muestras que resulten negativas deben repetirse si falla la reacción del control positivo.
- 8.1.3. Si las muestras desarrolladas por duplicado arrojan resultados incompatibles, realice un nuevo análisis o una nueva evaluación de las muestras.
- 8.1.4. Deben examinarse todos los controles antes de interpretar los resultados de las muestras. Si los controles no arrojan resultados correctos, la prueba no es válida, por lo que no pueden interpretarse las muestras.

Tabla 6: A continuación, se describe el análisis de cada uno de los controles, así como las decisiones que deben tomarse en función de los resultados.

Tipo de control	Resultado previsto	Resultado anómalo
Control sin molde	Ausencia de amplificación: continúe con el análisis.	Presencia de amplificación: repita la prueba.
Control policlonal	El tamaño de producto se ajusta al tamaño previsto en el apartado 10.1, <i>Tamaño previsto de los productos amplificados</i> . Ausencia de reordenamientos clonales. Continúe con el análisis.	Presencia de reordenamientos clonales. Repita la prueba.
Control positivo (puede usarse un control de la extracción si el material de referencia positivo abarca procesos de extracción)	El tamaño de producto se ajusta al tamaño previsto en el apartado 10.1, <i>Tamaño previsto de los productos amplificados</i> . Continúe con el análisis.	Repita la prueba.
Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño) (este control de amplificación es <u>esencial</u> para muestras cuya cantidad y calidad se desconoce)	Si se observan picos de 100, 200, 300, 400 y 600 pb, continúe con el análisis. Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb tenga una menor señal o que esté completamente ausente. Continúe con el análisis.	Si no se observan bandas, repita la prueba, <u>a menos que la muestra arroje un resultado positivo</u> . Si solo se observan 1, 2 o 3 bandas, vuelva a evaluar la muestra para comprobar la presencia de degradación del ADN, <u>a menos que la muestra arroje un resultado positivo</u> .

8.2. Interpretación de la muestra

Si los controles producen los resultados esperados, las muestras clínicas se deben interpretar del siguiente modo:

- 8.2.1. Si se observan una o más bandas positivas prominentes^a que se ajustan al intervalo de tamaños válidos, debe notificarse lo siguiente:
 - **“Positivo para la detección de una translocación *BCL1/JH* t(11;14) coherente con la presencia de una población de células clonales. De acuerdo con los criterios diagnósticos generales, las poblaciones de células clonales pueden indicar la presencia de neoplasias hematológicas”.**
- 8.2.2. Si no se observan bandas positivas^a que se ajusten al intervalo de tamaños válidos, debe notificarse lo siguiente:
 - **“Negativo para la detección de una translocación *BCL1/JH* t(11;14)”.**

^a**Nota:** Los criterios para definir una banda positiva son los siguientes:

- Los productos generados a partir de muestras que se encuentran dentro del intervalo de tamaños válidos y producen una(s) banda(s) discreta(s) distinguible(s) son coherentes con una banda positiva.

9. Limitaciones de procedimiento

- Esta prueba no identifica el 100 % de las poblaciones de células clonales.
- Esta prueba no es capaz de detectar de manera fiable menos de una (1) célula positiva por cada 1000 células normales.
- Los resultados de las pruebas de clonalidad molecular siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.
- Las pruebas por PCR están sujetas a interferencia por degradación del ADN o inhibición de la PCR por EDTA, heparina y otros compuestos.

10. Valores previstos

10.1. Tamaño previsto de los productos amplificados

- Los tamaños del amplicón indicados se determinaron utilizando una plataforma ABI o mediante electroforesis en gel.

Tabla 7: Tamaño previsto de los productos amplificados

Mezcla de reacción	Diana	ADN de control	Número de catálogo	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
<i>BCL1/J_H</i> Tube	MTC de <i>BCL1/J_H</i>	Intervalo de tamaños válidos IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40880550	150 – 2000^a 202, ~600 ^b
Specimen Control Size Ladder	Distintos genes	Intervalo de tamaños válidos IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	100, 200, 300, 400, 600^c 100, 200, 300, 400, 600 ^c

^a**Nota:** En condiciones subóptimas, se puede observar una banda inespecífica débil de ~550 pb. Para discriminar entre productos específicos e inespecíficos, verifique que el control negativo no genere esta banda; si está presente en el control negativo, el producto es inespecífico.

^b**Nota:** El producto de PCR de ~600 pb es inespecífico.

^c**Nota:** Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb presente una menor señal o esté completamente ausente.

10.2. Datos de la muestra

Los datos que se muestran abajo se generaron utilizando la mezcla de reacción indicada. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 2 %.

Tubo BCL1/J_H

Carril 1 = 100 % IVS-0010
Carril 2 = 10 % IVS-0010
Carril 3 = 1 % IVS-0010
Carril 4 = 0,1 % IVS-0010
Carril 5 = 100 % IVS-0010

Intervalo de tamaños
válidos = 150-2000 pb

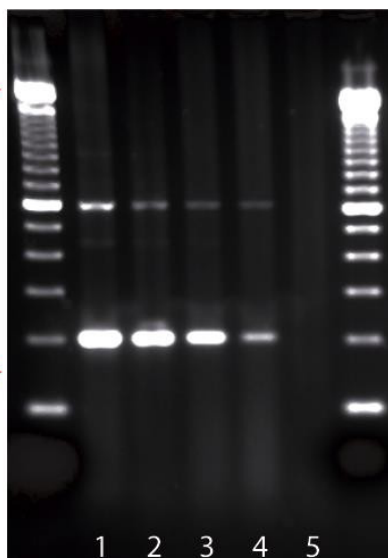


Figura 1. Mezcla de reacción *BCL1/J_H* Tube (Tubo de *BCL1/J_H*).

Specimen Control Size Ladder –
Unlabeled (Control de la muestra con
marcador de tamaño, sin marcar)

Carril 1 = marcador de 100 pb
Carril 1 = marcador de 50 pb
Carril 3 = ADN genómico
Carril 4 = ADN genómico

~600 pb →
~400 pb →
~300 pb →
~400 pb →
Tamaños del amplicón: ~100 pb →

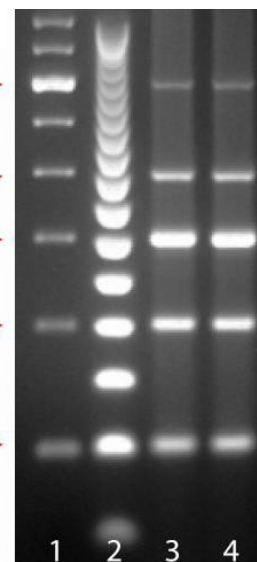


Figura 2. Mezcla de reacción Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño)

11. Eficacia diagnóstica

La eficacia analítica del IdentiClone *BCL1/J_H* Translocation Assay - Gel Detection se evaluó mediante el análisis de ADN de una línea celular positiva de linfoma de células del manto (LCM) *BCL1/J_H* enriquecido en ADN de amígdalas en seis diluciones diferentes. El límite de detección (LD) se observó en una dilución de ADN al 0,1 %. Para evaluar la precisión dentro del laboratorio, se observó una concordancia completa de los resultados en cuatro series de dos operadores durante dos días.

El IdentiClone *BCL1/J_H* Translocation Assay se diseñó por el grupo EuroClonality como parte de BIOMED-2 Concerted Action. Los estudios del diseño de su prueba, realizados en tres laboratorios utilizando 25 muestras de casos de LCM con translocaciones de *BCL1/J_H* y 18 muestras negativas, mostraron una concordancia del 100 % de muestras positivas (25 de 25 muestras) mediante detección de fluorescencia, y un 88 % (22 de 25 muestras) mediante la detección en gel. Para las muestras negativas, la concordancia fue del 100 % utilizando los formatos de detección en gel (18 de 18 muestras) y detección de fluorescencia (18 de 18 muestras). La especificidad para ambos formatos fue del 100 % y se determinó que la sensibilidad estaba entre 10⁻³ y 10⁻⁴. La sensibilidad es lo suficientemente alta para la detección del punto de ruptura de *BCL1/J_H* en el material diagnóstico. Sin embargo, solo el 40 % - 50 % de los puntos de ruptura de t(11;14) en el MCL se detectarán mediante PCR y se recomiendan herramientas de métodos de detección adicionales para el diagnóstico de puntos de ruptura que no se encuentran dentro de la región del conglomerado de translocación principal.⁶

12. Bibliografía

- Huret, JL. t(11;14)(q13;q32). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* May 1998.
- Coignet, LJA *et al.* Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double color Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Blood* 1996, **87**:1512-1519.
- Vaandrager, J *et al.* Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1996, **88**:1177-1182.
- De Boer, CJ *et al.* Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Oncogene* 1995, **10**:1833-1840.
- De Boer, CJ *et al.* Cyclin D1 protein overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Blood* 1995, **86**:2715-2723.
- Van Dongen, JJM *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003, **17**(12):2257-2317.

13. Servicio técnico y atención al cliente

Los representantes del servicio técnico y de atención al cliente están disponibles de lunes a viernes para responder a sus preguntas por teléfono, correo electrónico o web.

Datos de contacto

Invivoscribe, Inc.
10222 Barnes Canyon Road, Bldg. 1
San Diego, California 92121-2711
Estados Unidos

Teléfono: +1 858 224-6600
Fax: +1 858 224-6601
Servicio técnico: support@invivoscribe.com
Atención al cliente: sales@invivoscribe.com
Sitio web: www.invivoscribe.com
Horario comercial: De 07:00 a 17:00 PST/PDT

Representante autorizado y asistencia técnica en la UE

 Invivoscribe Technologies, SARL
Le Forum – Bât B
515 Avenue de la Tramontane
ZI Athélia IV
13600 La Ciotat, Francia

Teléfono: +33 (0)4 42 01 78 10
Fax: +33 (0)4 88 56 22 89
Servicio técnico: support@invivoscribe.com
Atención al cliente: sales-eu@invivoscribe.com
Sitio web: www.invivoscribe.com
Horario comercial: De 09:00 a 17:00 CET/CEST

14. Símbolos

Los siguientes símbolos figuran en el etiquetado de los productos de diagnóstico de Invivoscribe.

	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>		Fecha de caducidad
	Número de catálogo		Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Volumen de reactivo		Fabricante
	Número de lote		Consulte las instrucciones de uso
	Condiciones de conservación		

15. Aviso legal

15.1. Garantía y responsabilidad

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) se compromete a suministrar productos de primera calidad. Invivoscribe® garantiza que sus productos cumplen e incluso superan los criterios de rendimiento descritos en las Instrucciones de uso por lo que respecta a los productos cubiertos. Si alguno de los productos no funciona de acuerdo con las especificaciones indicadas para el producto en cuestión, nuestra política es reemplazar el producto o abonar el precio total de compra. Invivoscribe® no ofrece ninguna otra garantía, explícita o implícita. La responsabilidad de Invivoscribe® se limita al precio de compra del producto. Invivoscribe no se responsabilizará de daños directos, indirectos, consecuentes o accidentales derivados del uso, los resultados del uso o la imposibilidad de usar sus productos. Debe establecerse y controlarse continuamente la eficacia del producto en condiciones controladas por el comprador y en su laboratorio a través de procesos definidos y controlados por el comprador, entre los que se incluyen las pruebas con controles positivos, negativos y sin molde cada vez que se analiza una muestra. El pedido, la aceptación y el uso del producto constituyen la aceptación por parte del comprador de la responsabilidad exclusiva de garantizar la eficacia del producto y el acuerdo del comprador con la limitación de responsabilidad.

Este es un producto de diagnóstico *in vitro* que no está disponible para su venta o uso en Norteamérica.

15.2. Patentes y marcas registradas

Este producto está cubierto por una o más de las siguientes: patente europea número 1549764, patente europea número 2418287, patente europea número 2460889, patente japonesa número 4708029, patente estadounidense número 8859748. Solicitudes pendientes y futuras relacionadas. Todas estas patentes y solicitudes se limitan únicamente a Invivoscribe®. También son aplicables patentes adicionales cuyo uso se ha autorizado a Invivoscribe. Muchos de estos productos implican el uso de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante la compra de este producto no se transmite de manera explícita ni implícita ninguna de las licencias de uso de estas patentes sobre enzimas o procesos de amplificación.

IdentiClone® es una marca comercial registrada de Invivoscribe®.

©2020 Invivoscribe, Inc. Todos los derechos reservados. Las marcas comerciales que figuran en este documento son propiedad de Invivoscribe, Inc., de sus filiales o, en el caso de las marcas comerciales de terceros, de sus respectivos propietarios.

15.3. Aviso para el comprador: SOLO para DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq

Este producto está a la venta únicamente para su uso en investigación en el Espacio Económico Europeo (EEE). No debe revenderse ni transferirse a terceros. El uso de este producto está cubierto por la patente estadounidense número 6127155 y las solicitudes de patentes pertinentes de fuera de los Estados Unidos. El comprador del producto puede usar únicamente la cantidad de producto necesaria para realizar investigaciones de carácter interno. No se otorgan de forma explícita derechos relacionados con otras solicitudes de patente ni derechos a prestar servicios comerciales de ningún tipo, entre los que se incluyen la notificación de resultados de las actividades del comprador a cambio de honorarios u otra consideración comercial. Este producto es solo para uso en investigación. De acuerdo con Roche, los usos para el diagnóstico en humanos y animales requieren una licencia específica de Roche. Todos los usos distintos de las investigaciones de carácter interno y los usos para diagnóstico en humanos y animales relacionados con la patente de Roche requieren una licencia específica de Thermo Fisher Scientific. Al usar este producto, reconoce su aceptación de lo anterior. Para saber más sobre la compra de licencias de Roche, póngase en contacto con el Departamento de Licencias de Roche Molecular Systems, Inc., 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, California 94588 (Estados Unidos) o con Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (Alemania). Para saber más sobre la compra de licencias de Thermo Fisher Scientific, póngase en contacto con el Departamento de Licencias de Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008 (Estados Unidos).