

Instrucciones de uso

CE IVD

IdentiClone® *BCL2/J_H* Translocation Assay

Para la identificación de linfomas de células foliculares y otros linfomas y leucemias.

IVD Para uso diagnóstico *in vitro*



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

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

N.º de catálogo	Productos	Cantidad
REF 93090020	IdentiClone <i>BCL2/J_H</i> Translocation Assay – Gel Detection	33 reacciones
REF 93090040	IdentiClone <i>BCL2/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
2.2.	Descripción general	3
3.	PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO	4
3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	4
3.2.	Detección mediante gel.....	4
4.	REACTIVOS	5
4.1.	Componentes del reactivo	5
4.2.	Advertencias y precauciones	6
4.3.	Conservación y manipulación.....	6
5.	INSTRUMENTAL.....	7
5.1.	Termociclador	7
5.2.	Unidad de electroforesis.....	7
5.3.	Unidad de iluminación UV	7
6.	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	8
6.1.	Precauciones	8
6.2.	Sustancias interferentes	8
6.3.	Requisitos y manipulación de las muestras.....	8
6.4.	Preparación de las muestras	8
6.5.	Conservación de las muestras	8
7.	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	8
7.1.	Materiales suministrados	8
7.2.	Materiales necesarios (no suministrados)	9
7.3.	Preparación de los reactivos	10
7.4.	Amplificación	11
7.5.	Detección en gel – Geles TBE de poliacrilamida	11
7.6.	Control de calidad.....	12
7.7.	Controles positivos recomendados.....	12
8.	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	12
8.1.	Análisis.....	12
8.2.	Interpretación de las muestras	13
9.	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	13
10.	VALORES PREVISTOS.....	14
10.1.	Tamaño previsto de los productos amplificados.....	14
10.2.	Datos de la muestra	14
11.	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	15
12.	REFERENCIAS	15
13.	SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE	16
14.	SÍMBOLOS.....	16
15.	AVISO LEGAL.....	17
15.1.	Garantía y responsabilidad	17
15.2.	Patentes y marcas registradas.....	17
15.3.	Aviso para el comprador: SOLO para DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq.....	17

1. Uso previsto

IdentiClone *BCL2/J_H* Translocation Assay es un producto de diagnóstico *in vitro* diseñado para la detección mediante PCR de las translocaciones de genes *BCL2/J_H* t(14;18) en pacientes con sospecha de trastornos linfoproliferativos y puede utilizarse para:

- Distinguir el linfoma de la hiperplasia linfoide benigna
- Distinguir el linfoma folicular de otros linfomas de linfocitos B de aspecto similar
- Controlar y evaluar las recidivas de la enfermedad

2. Resumen y explicación de la prueba

2.1. Antecedentes

La translocación de *BCL2* t(14;18) (q32;q21) se encuentra en el 80-90 % de los linfomas foliculares y en el 30 % de los linfomas macrocíticos difusos; sin embargo, esta translocación rara vez está presente en otras enfermedades linfoproliferativas. t(14;18) produce una yuxtaposición del gen *BCL2* con el segmento de unión del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGH*). Esto produce a un marcado aumento de la expresión de bcl-2 impulsado por el potenciador del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina. La proteína bcl-2 inhibe la muerte celular programada (apoptosis) que produce la acumulación celular.

La mayoría de los puntos de rotura en 18q21-22 se producen dentro de la región mayor de puntos de rotura (Mbr) en la región no traducida 3' del exón 3 (60-70 % de los casos), y en la región del conglomerado menor (mcr) ubicada en la región 3' hacia el exón 3 de *BCL2* (20-25 % de los casos). Algunos puntos de rotura se producen en loci distantes y no serán identificados por esta prueba en particular. Por lo tanto, un resultado negativo no excluye completamente la presencia de un reordenamiento genético *BCL2/IGH* en la muestra.¹

Los ensayos IdentiClone de Invivoscribe representan un nuevo enfoque para las pruebas de clonalidad mediante PCR. Estas pruebas se han optimizado minuciosamente mediante el análisis de muestras de control positivo y negativo con varias 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 ha realizado en más de treinta conocidos centros de análisis de toda Europa, como parte de un estudio colaborativo denominado BIOMED-2 Concerted Action.²

Las pruebas de detección mediante gel no detectan de forma fiable aquellas poblaciones clonales que representan menos del 1 % de la población de linfocitos total. **Interprete siempre los resultados de esta prueba teniendo en cuenta los datos morfológicos y otros datos relevantes, y evite utilizarla por sí sola para un diagnóstico de neoplasia maligna.**

2.2. Descripción general

Este kit de prueba incluye cuatro (4) mezclas de reacción. Las mezclas de reacción de translocación de *BCL2/J_H* (*BCL2/J_H* Tube A, B y C [Tubo A, B y C de *BCL2/J_H*]) hibridan en la región de unión (J) del gen de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IGH*) y en distintas regiones del gen *BCL2*. Estas mezclas de reacción se utilizan para detectar la región mayor de puntos de rotura (Mbr) y la región del conglomerado menor (mcr) de las translocaciones t(14;18) de *BCL2*. La cuarta mezcla de reacción, 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 y garantizar que la calidad y la cantidad de ADN sean suficientes para que el resultado sea válido. En muchos de nuestros ensayos 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 ensayos diferentes.

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)

Los ensayos de PCR se utilizan de manera rutinaria para la identificación de translocaciones cromosómicas. Estos ensayos apuntan a las regiones Mbr y mcr de las translocaciones $BCL2/J_H$ y amplifican ADN genómico situado entre los cebadores que hibridan en el gen $BCL2$ y en las regiones conservadas de unión (J) del gen IGH ($BCL2/J_H$ Tubos A, B y C [Tubos A, B y C de $BCL2/J_H$]). Los puntos de rotura que se producen por fuera de las regiones Mbr y mcr no serán identificados por este ensayo en particular. Por lo tanto, un resultado negativo no excluye completamente la presencia de un reordenamiento genético $BCL2/J_H$ en la muestra.¹ El ADN de una población normal de linfocitos también arrojará un resultado negativo.



- t(14;18) Tubo A: dos (2) cebadores $BCL2$ MBR + un (1) cebador J_H
- t(14;18) Tubo B: cuatro (4) cebadores $BCL2$ 3'MBR + un (1) cebador J_H
- t(14;18) Tubo C: tres (3) cebadores $BCL2$ mcr + un (1) cebador J_H

Figura 1. Representación de un diagrama esquemático de la translocación $BCL2/J_H$ t(14;18) mostrando el gen $BCL2$ a la izquierda y el gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGH) a la derecha. Se muestran las posiciones relativas y orientaciones de los cebadores de la región mayor de puntos de rotura (Mbr), de los cebadores de la región del conglomerado menor (mcr) y del cebador J_H , que están incluidos en los 3 tubos de mezclas de reacción $BCL2/J_H$.

3.2. Detección mediante 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 productos del amplicón en función de su tamaño, carga y conformación. Dado que el ADN está cargado negativamente, cuando se aplica 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, provocando 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: Ensayos disponibles

N.º de catálogo	Descripción	Cantidad
REF 93090020	IdentiClone <i>BCL2/JH</i> Translocation Assay – Gel Detection	33 reacciones
REF 93090040	IdentiClone <i>BCL2/JH</i> Translocation Assay MegaKit – Gel Detection	330 reacciones

Tabla 2: Componentes del kit

Reactivo	N.º de catálogo (REF)	Componentes del reactivo (ingredientes activos)	Cantidad por unidad	N.º de unidades 93090020	N.º de unidades 93090040	Temp. de conservación
Mezclas de reacción	23090050CE	<i>BCL2/JH</i> Tube A – Unlabeled (Tubo A de <i>BCL2/JH</i> - Sin marcar) Distintos oligonucleótidos que hibridan en la región mayor de puntos de rotura (Mbr) del gen <i>BCL2</i> y en la región J del gen <i>IGH</i> en solución salina tamponada.	1500 µL	1	10	-85 °C  -65 °C
	23090060CE	<i>BCL2/JH</i> Tube B – Unlabeled (Tubo B de <i>BCL2/JH</i> - Sin marcar) Distintos oligonucleótidos que hibridan en la región 3' del conglomerado mayor de puntos de rotura (3' Mbr) del gen <i>BCL2</i> y en la región J del gen <i>IGH</i> en solución salina tamponada.	1500 µL	1	10	
	23090070CE	<i>BCL2/JH</i> Tube C – Unlabeled (Tubo C de <i>BCL2/JH</i> - Sin marcar) Distintos oligonucleótidos que hibridan en la región del conglomerado menor (mcr) del gen <i>BCL2</i> y en la región J del gen <i>IGH</i> en solución salina tamponada.	1500 µL	1	10	
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	40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0030) 200 µg/mL de ADN en solución TE 1/10	100 µL	1	5	2 °C  8 °C o -85 °C  -65 °C
	40900070	IVS-P002 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-P002) 1600 pg/mL de ADN plasmídico diluido en IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de control policlonal IVS-0000) en solución TE 1/10	100 µL	1	5	
	40881810	IVS-0031 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0031) 200 µg/mL de ADN en solución TE 1/10	100 µL	1	5	
ADN de control negativo (normal)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de control policlonal IVS-0000) 200 µg/mL de ADN en solución TE 1/10	100 µL	1	5	

Nota: En la fabricación de este kit no se han utilizado conservantes.

4.2. Advertencias y precauciones

- **IVD** Este producto es para uso diagnóstico *in vitro*.
- Utilice este kit de ensayo 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 estricto cumplimiento del protocolo garantiza un rendimiento y una reproducibilidad óptimos. Asegúrese de usar el programa adecuado del termociclador, 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 personal 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 la 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 ensayo, **consérvelos a una temperatura de 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 largo plazo entre -85°C y -65°C .
- Todos los reactivos y controles deben descongelarse y mezclarse en un agitador vortex o bien mezclarse exhaustivamente antes de usarse para garantizar su completa 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
- Características de rendimiento y especificación:
 - Intervalo térmico mínimo: entre 15°C y 96°C
 - Velocidad mínima de rampa: 0,8°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
- Características de rendimiento y especificación:
 - Capacidad de funcionar de 35 V a 135 V durante un tiempo prolongado
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante

5.3. Unidad de iluminación UV

- Uso o función: detección de ADN
- Características de rendimiento y especificación:
 - Capacidad de emitir luz a una longitud de onda de aprox. 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 potencialmente 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

Este ensayo analiza el **ADN genómico** (ADNg) de 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 enviados 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 (conservados a entre 2°C y 8°C y transportados a temperatura ambiente)
- Tejido o cortes fijados en formol e incluidos en parafina (conservados y enviados a temperatura ambiente)

6.4. Preparación de la muestra

Extraiga el ADNg 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 ensayo 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 Specimen Control Size Ladder Master Mix (Mezcla de reacción de 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 la muestra

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 ensayo

7.1. Materiales suministrados

Tabla 3: Componentes del kit

N.º de catálogo	Descripción
 23090050CE	<i>BCL2</i> / <i>JH</i> Tube A – Unlabeled (Tubo A de <i>BCL2</i> / <i>JH</i> - Sin marcar)
 23090060CE	<i>BCL2</i> / <i>JH</i> Tube B – Unlabeled (Tubo B de <i>BCL2</i> / <i>JH</i> - Sin marcar)
 23090070CE	<i>BCL2</i> / <i>JH</i> Tube C – Unlabeled (Tubo C de <i>BCL2</i> / <i>JH</i> - Sin marcar)
 20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (Control de la muestra con marcador de tamaño - Sin marcar)
 40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0030)
 40900070	IVS-P002 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-P002)
 40881810	IVS-0031 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0031)
 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/materiales y proveedores recomendados	N.º de catálogo (REF)	Notas
ADN polimerasa	Roche: <ul style="list-style-type: none"> DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq Invivoscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> 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: <ul style="list-style-type: none"> 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	Bio-Rad: <ul style="list-style-type: none"> MJ Research PTC-100 o PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> PE 9600 o PE 9700 	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 poliacrilamida.
Bromuro de etidio	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Bromuro de etidio UltraPure™ 10 mg/mL 	15585-011	N. P.
Geles de poliacrilamida 6 %	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Geles Novex® TBE (6 %, 12 pocillos) 	EC62652Box	N. P.
Tampón TBE de migración	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Tampón TBE de migración Novex (5X) 	LC6675	Diluir a 1:5 antes del uso.
Tampón de carga de gel	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Tampón de carga de gel 10X BlueJuice™ Tampón 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: <ul style="list-style-type: none"> 100 bp DNA Ladder (Marcador de ADN de 100 pb) TrackIt™ 	10488-058	N. P.

¹Nota: 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 Specimen Control Size Ladder Master Mix 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, será necesario realizar un nuevo análisis o una nueva evaluación de la muestra.
- Analice los controles **positivos, negativos y blancos** de cada mezcla de reacción.
- Es recomendable combinar varias muestras en un mismo análisis para evitar que se agote el control negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA). Si no resulta práctico combinar muestras, puede comprar el IVS-0000 Polyclonal Control DNA por separado.

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

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.

- Los volúmenes de las partes son de 45 μL para cada reacción.
- Incluya un volumen de 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 x 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 blanco (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo
<hr/>	
n = 2 x n.º de muestras + 4	Total

- Por lo tanto, el volumen total de la parte para cada mezcla de reacción es **n x 45 μL** .
- Para Specimen Control Size Ladder Master Mix, 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 blanco (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo
<hr/>	
m = n.º de muestras + 3	Total

- Por lo tanto, el volumen total de la parte de Specimen Control Size Ladder Master Mix (Mezcla de reacción de control de la muestra con marcador de tamaño) es **m x 45 μL** .

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

- La ADN Taq polimerasa total pipeteada a cada mezcla de reacción es **n x 0,25 μL** y **m x 0,25 μL** para la Specimen Control Size Ladder Master Mix (Mezcla de reacción de control de la muestra con marcador de tamaño).
- 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 preparar el reactivo, las placas o tubos para PCR pueden conservarse entre 2 $^{\circ}\text{C}$ y 8 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas como máximo.

Guía rápida:

Por cada mezcla de reacción y **n** reacciones, mezcle:

n ×45µ L Mezcla de reacción

n ×0,25µ L ADN Taq polimerasa

Mezcle suavemente en el agitador vortex.

Pipetee **45 µL** de la mezcla de reacción + la solución de ADN polimerasa en cada pocillo.

Añada **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 el termociclador 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 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 TBE de poliacrilamida

7.5.1. Prepare un gel de agarosa MetaPhor o NuSieve 3:1 al 2 % en solución tampón TBE 1X.

7.5.2. Coloque el gel en la unidad de electroforesis y cúbralo con el 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 luego cargue 4 µL 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 se pueden procesar una sola vez cada vez que se realiza la prueba, a fin de garantizar un rendimiento adecuado. Además, incluye un control blanco (*p. ej.*, agua) para saber si la mezcla de reacción se ha contaminado y si existe contaminación cruzada en las reacciones. También se puede agregar un control de tampón para garantizar que el tampón usado para resuspender las muestras no se haya contaminado. 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	N.º de catálogo	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
<i>BCL2/J_H</i> Tube A)	Mbr de <i>BCL2/J_H</i>	Intervalo de tamaño válido IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	100 - 2500 254, aprox. 750 ^a
<i>BCL2/J_H</i> Tube B	3' Mbr de <i>BCL2/J_H</i>	Intervalo de tamaño válido IVS-P002 Clonal Control DNA	--- 40900070	100 - 2500 Aprox. 140
<i>BCL2/J_H</i> Tube C	mcr de <i>BCL2/J_H</i>	Intervalo de tamaño válido IVS-0031 Clonal Control DNA	--- 40881810	100 - 2500 382, aprox. 800 ^a
Specimen Control Size Ladder	Varios genes	Intervalo de tamaño válido IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	100, 200, 300, 400, 600^b 100, 200, 300, 400, 600 ^b

^a**Nota:** La banda de aprox. 750 pb (*BCL2/J_H* Tube A [Tubo A de *BCL2/J_H*]) y la banda de aprox. 800 pb (*BCL2/J_H* Tube C [Tubo C de *BCL2/J_H*]) son por lo general bandas débiles.

^b**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 válido 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: **“No se puede notificar un resultado para esta muestra porque la cantidad o la calidad del ADN eran insuficientes para su análisis”**.
- 8.1.2. Repita el análisis de las muestras que den negativo si falló la reacción del control positivo.
- 8.1.3. Si las muestras procesadas por duplicado arrojan resultados incompatibles, vuelva a analizar o a evaluar las muestras por si se han cambiado.
- 8.1.4. Todos los controles de las pruebas deben examinarse 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 7. 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 blanco	Ausencia de amplificación: continúe con el análisis.	Presencia de amplificación: repita el ensayo.
Control policlonal	El tamaño del producto es coherente con el 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 el ensayo.
Control positivo (también puede usarse un control de extracción si el material de control positivo abarca procesos de extracción)	El tamaño del producto es coherente con el tamaño previsto en el apartado 10.1: <i>Tamaño previsto de los productos amplificados.</i> Continúe con el análisis.	Repita el ensayo.
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. Debido a 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 el ensayo, <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 las muestras

Si los controles arrojan los resultados previstos, interprete las muestras clínicas del siguiente modo:

- 8.2.1. Si se observan una o más bandas positivas^a prominentes que se ajustan al intervalo de tamaño válido, debe notificarse lo siguiente:
- “**Positivo para la detección de una translocación *BCL2/J_H t(14;18)* 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 tamaño válido, debe notificarse lo siguiente:
- “**Negativo para la detección de una translocación *BCL2/J_H t(14;18)***.”

^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 tamaño válido y producen una(s) banda(s) discreta(s) distinguible(s) son coherentes con una banda positiva.

9. Limitaciones del procedimiento

- Este ensayo no identifica el 100 % de las poblaciones de células clonales.
- Este ensayo no es capaz de detectar de manera fiable menos de una (1) célula positiva por cada 100 células normales.
- Los resultados de las pruebas de clonalidad molecular siempre deben interpretarse teniendo en cuenta los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.
- Los ensayos de tipo PCR están sujetos 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 8: Tamaño previsto de los productos amplificados

Mezcla de reacción	Diana	ADN de control	N.º de catálogo	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
<i>BCL2/J_H</i> Tube A	Mbr de <i>BCL2/J_H</i>	Intervalo de tamaño válido	---	100 - 2500
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	---
		IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	254, aprox. 750 ^a
		IVS-0031 Clonal Control DNA	40881810	---
<i>BCL2/J_H</i> Tube B	3' Mbr de <i>BCL2/J_H</i>	Intervalo de tamaño válido	---	100 - 2500
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	---
		IVS-P002 Clonal Control DNA	40900070	Aprox. 140
		IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	---
<i>BCL2/J_H</i> Tube C	mcr de <i>BCL2/J_H</i>	Intervalo de tamaño válido	---	100 - 2500
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	---
		IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	---
		IVS-0031 Clonal Control DNA	40881810	382, aprox. 800 ^a
Specimen Control Size Ladder	Varios genes	Intervalo de tamaño válido	---	100, 200, 300, 400, 600^b
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	100, 200, 300, 400, 600 ^b

^a**Nota:** La banda de aprox. 750 pb (*BCL2/J_H* Tube A [Tubo A de *BCL2/J_H*]) y la banda de aprox. 800 pb (*BCL2/J_H* Tube C [Tubo C de *BCL2/J_H*]) son por lo general bandas débiles.

^b**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.

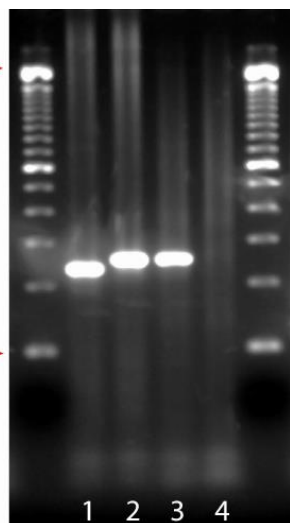
10.2. Datos de la muestra

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 %.

BCL2/J_H Tube A

Carril 1 = 100 % IVS-0007
Carril 2 = 100 % IVS-0030
Carril 3 = 1 % IVS-0030
Carril 4 = 100 % IVS-0000

Intervalo de tamaño válido = 100-2500 pb



BCL2/J_H Tube B

Carril 1 = 100 % IVS-0007
Carril 2 = 100 % IVS-P002
Carril 3 = 1 % IVS-P002
Carril 4 = 100 % IVS-0000

Intervalo de tamaño válido = 100-2500 pb

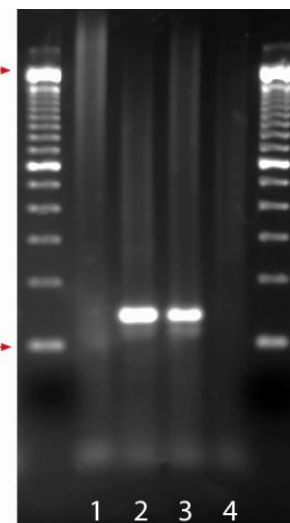


Figura 2. Mezcla de reacción de *BCL2/J_H* Tube A.

Figura 3. Mezcla de reacción de *BCL2/J_H* Tube B.

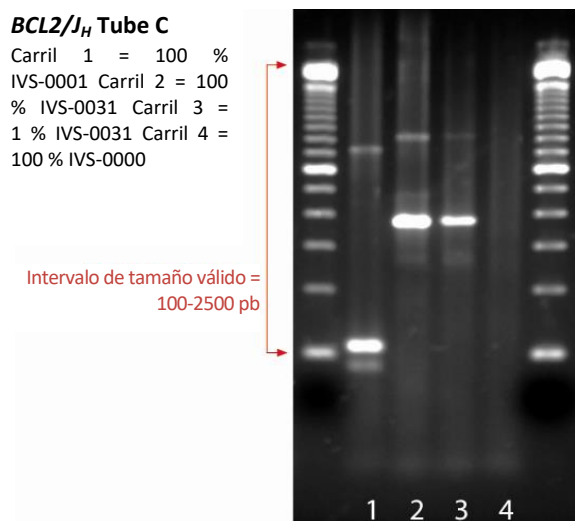


Figura 4. Mezcla de reacción de BCL2/J_H Tube C (Tubo C de BCL2/J_H).

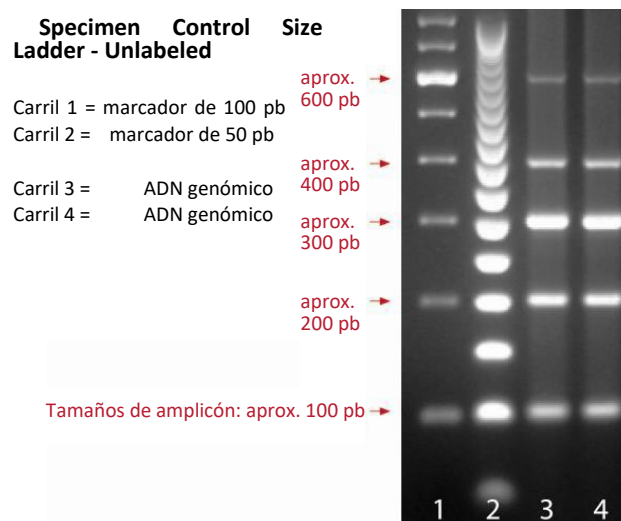


Figura 5. Specimen Control Size Ladder Master Mix (Mezcla de reacción de control de la muestra con marcador de tamaño)

11. Características de rendimiento

La evaluación inicial de este ensayo se realizó en tres laboratorios con ADN obtenido de 124 casos de linfoma de células foliculares (LCF) que portaban la translocación t(14;18). Mediante este ensayo PCR se identificaron 109 casos con el gen de fusión BCL2/J_H (88 %). La prueba y la evaluación final se realizaron en muestras en 11 laboratorios independientes. Se observaron falsos positivos (0,4 %) en solo 12 de 3036 análisis.

IdentiClone BCL2/J_H Translocation Assay fue más sensible que el análisis Southern blot. La sensibilidad fue ligeramente diferente entre las mezclas de reacción. No obstante, se determinó que la sensibilidad general del ensayo se situaba entre una (1) célula positiva en 10² células normales (1,0 %) y una (1) célula positiva en 10³ células normales (0,1 %).

En conclusión, se evaluaron las características de rendimiento de este robusto ensayo PCR de multiplicación de tres tubos para maximizar la detección del punto de rotura de t(14;18). Esta estrategia es capaz de amplificar a través de la región del punto de rotura en la mayoría de los casos de linfoma folicular con translocaciones definidas citogenéticamente.

12. Referencias

1. Miller, J. E.; Wilson, S.S.; Jaye, D.J.; Kronenberg, M. (1999): An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Molecular Diagnostics*. 4:101-117.

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

EC|REP 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 9:00 a 17:00 CET/CEST

14. Símbolos

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



Para uso diagnóstico *in vitro*



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 blancos 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, y 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).