



**BCL2 oligomix Alert kit**  
búsqueda del ADN BCL2-IgH MBR y mcr

REF BANG08-02

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El procedimiento prevé la realización de tres tipos de reacciones de amplificación, MBR, mcr y ABL con un termostato programable (thermal - cycler).

La reacción MBR prevé dos reacciones de amplificación sucesivas (nested), específicas para el reordenamiento BCL2-IgH, variante MBR (MBR).

La reacción mcr prevé dos reacciones de amplificación sucesivas (nested), específicas para el reordenamiento BCL2-IgH, variante mcr (mcr).

La reacción ABL prevé una sola reacción de amplificación (single round) específica para el gen ABL (ABL) que se utiliza como control de idoneidad de la muestra.

En el caso de las reacciones MBR y mcr una primera reacción de amplificación específica para una región del reordenamiento BCL2-IgH es realizada en la primera probeta partiendo del ADN extraído de las muestras en examen. Luego una segunda reacción de amplificación específica para el reordenamiento es realizada en la segunda probeta partiendo del producto de la primera reacción de amplificación.

La presencia de los productos específicos de la segunda reacción de amplificación indica la presencia del ADN del reordenamiento BCL2-IgH en la muestra de partida.

En el caso de la reacción ABL, la reacción de amplificación específica para una región del gen ABL es realizada en la probeta partiendo del producto de la primera reacción de amplificación.

La presencia del producto específico de la amplificación de control indica la presencia del ADN del gen ABL en la muestra de partida.

### DESCRIPCIÓN DEL KIT

El kit provee los siguientes componentes:

#### MBR OligoMIX y mcr OligoMIX de primera amplificación

Mezclas optimizadas de reactivos para la amplificación de los ácidos nucleicos en una solución estabilizadora, **previamente dosificadas en probetas «monotest» listas para su uso**. Cada probeta contiene 40 µL de solución y 50 µL de aceite de vaselina.

**MBR OligoMIX** está dosificada en **probetas «monotest» AZULES**.

**mcr OligoMIX** está dosificada en **probetas «monotest» NEUTRAS**.

Las mezclas de reactivos proveen los oligonucleótidos primers de la primera amplificación, el sistema tampón, el cloruro de magnesio y los nucleótidos trifosfatos.

En el caso de **MBR OligoMIX**, los oligonucleótidos primers son específicos para las regiones genómicas **MBR e IgH**.

En el caso de **mcr OligoMIX**, los oligonucleótidos primers son específicos para las regiones genómicas **mcr e IgH**.

#### MBR OligoMIX y mcr OligoMIX de segunda amplificación

Mezclas optimizadas de reactivos para la amplificación de los ácidos nucleicos en una solución estabilizadora, **previamente dosificada en probetas «monotest» listas para su uso**. Cada probeta contiene 44 µL de solución y 50 µL de aceite de vaselina.

**MBR OligoMIX** está dosificada en **probetas «monotest» ROJAS**.

**mcr OligoMIX** está dosificada en **probetas «monotest» VERDES**.

Las mezclas de reactivos proveen los oligonucleótidos primers de la segunda amplificación, el sistema tampón, el cloruro de magnesio y los nucleótidos trifosfatos.

En el caso de **MBR OligoMIX**, los oligonucleótidos primers son específicos para las regiones genómicas **MBR e IgH**.

En el caso de **mcr OligoMIX**, los oligonucleótidos primers son específicos para las regiones genómicas **mcr e IgH**.

## BCL2 oligomix Alert kit

### búsqueda del ADN BCL2-IgH MBR y mcr

REF BANG08-02



### ÍNDICE

USO PREVISTO	pág. 1
PRINCIPIO DE LA PRUEBA	pág. 2
DESCRIPCIÓN DEL KIT	pág. 2
MATERIAL PROVISTO EN EL KIT	pág. 3
MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL KIT	pág. 4
OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS	pág. 4
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	pág. 4
MUESTRAS Y CONTROLES	pág. 6
PROCEDIMIENTO	pág. 7
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	pág. 13
CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES	pág. 14
BIBLIOGRAFÍA	pág. 15
PROBLEMAS Y SOLUCIONES	pág. 16
SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS	pág. 18

### USO PREVISTO

El producto «**BCL2 oligomix Alert kit**» es una prueba de amplificación cualitativa de los ácidos nucleicos para la **búsqueda del ADN del reordenamiento BCL2-IgH, translocación t(14;18), variantes MBR y mcr** en el ADN extraído de muestras de sangre periférica recolectada en EDTA, sangre medular recolectada en EDTA o citrato de sodio, y muestras de biopsias frescas y congeladas.

El producto se utiliza, junto con los datos clínicos y otros exámenes de laboratorio, en el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad mínima residual en pacientes afectados por el linfoma folicular o linfoma de células grandes.

**ABL OligoMIX para la amplificación de control**

Una mezcla optimizada de reactivos para la amplificación de los ácidos nucleicos en una solución estabilizadora, **previamente dosificada en probetas «monotes» AMARILLAS listas para su uso.** Cada probeta contiene 40 µL de solución y 50 µL de aceite de vaselina.

La mezcla de reactivos provee los oligonucleótidos primers de la amplificación de control, el sistema tampón, el cloruro de magnesio y los nucleótidos trifosfatos.

Los oligonucleótidos primers son específicos para el gen **ABL**.

El kit permite efectuar **25 reacciones**, controles positivos y negativos incluidos.

**MATERIAL PROVISTO EN EL KIT**

Componente	Descripción	Cantidad	Composición	Etiquetado
<b>MBR OligoMIX de primera amplificación</b>	mezcla de amplificación en <b>probetas AZULES</b> de 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleótidos externos, Cloruro de potasio, TRIS base, TRIS clorhidrato, Triton X-100, Cloruro de magnesio, Desoxinucleótidos trifosfatos, aceite de vaselina	-
<b>mcr OligoMIX de primera amplificación</b>	mezcla de amplificación en <b>probetas NEUTRAS</b> de 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleótidos externos, Cloruro de potasio, TRIS base, TRIS clorhidrato, Triton X-100, Cloruro de magnesio, Desoxinucleótidos trifosfatos, aceite de vaselina	-
<b>ABL OligoMIX amplificación de control</b>	mezcla de amplificación en <b>probetas AMARILLAS</b> de 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleótidos, Cloruro de potasio, TRIS base, TRIS clorhidrato, Triton X-100, Cloruro de magnesio, Desoxinucleótidos trifosfatos, aceite de vaselina	-
<b>MBR OligoMIX de segunda amplificación</b>	mezcla de amplificación en <b>probetas ROJAS</b> de 0,2 mL	25 x 94 µL	Oligonucleótidos internos, Cloruro de potasio, TRIS base, TRIS clorhidrato, Triton X-100, Cloruro de magnesio, Desoxinucleótidos trifosfatos, aceite de vaselina	-
<b>mcr OligoMIX de segunda amplificación</b>	mezcla de amplificación en <b>probetas VERDES</b> de 0,2 mL	25 x 94 µL	Oligonucleótidos internos, Cloruro de potasio, TRIS base, TRIS clorhidrato, Triton X-100, Cloruro de magnesio, Desoxinucleótidos trifosfatos, aceite de vaselina	-

**MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL KIT**

- Campana de flujo laminar
- Guantes sin polvo descartables de látex o similares.
- Microcentrífuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas y tips estériles con filtro para aerosol o de desplazamiento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Agua bidestilada estéril.
- Termostato programable (thermal - cycler).

**OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS**

Los reactivos para la extracción del ADN de las muestras a analizar para el control positivo de amplificación y para la detección del ADN amplificado, **no** están incluidos en este kit. Para realizar estas fases analíticas se aconseja la utilización de los siguientes kits accesorios producidos por ELITechGroup S.p.A.

«**EXTRAcell**» (código EXTD02), kit de extracción del ADN de muestras celulares; el kit permite efectuar 50 extracciones.

«**EXTRAffin**» (código EXTF01), kit de extracción de ácidos nucleicos de muestras de biopsias; el kit permite efectuar 50 extracciones.

«**BCL2 - Positive Control**» (código CTRG08), control positivo de amplificación de ADN plasmídico; el kit provee control para 25 sesiones.

«**DNA polymerase 2U / µL**» (código ER40 y ER140), enzima ADN polimerasa termoestable para la amplificación de los ácidos nucleicos; los kits permiten efectuar 125 reacciones.

«**ELECTROPHORESIS 3**» (código EPH03), detección del ADN amplificado por electroforesis en gel de agar; el kit permite efectuar 120 detecciones.

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

**Este kit es para uso exclusivo *in vitro*.**

**Advertencias y precauciones generales**

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si pudiesen transmitir agentes infecciosos. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. No producir salpicaduras ni aerosol. El material que está en contacto con las muestras biológicas debe ser tratado con hipoclorito de sodio al 3% por al menos 30 minutos o bien, tratado en autoclave a 121° C durante una hora antes de ser eliminado.

Manipular y eliminar todos los reactivos y todos los materiales usados para realizar la prueba como si fuesen agentes infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. No producir salpicaduras ni aerosol. Los residuos deben ser tratados y eliminados según normas de seguridad adecuadas. El material combustible monouso debe ser incinerado. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben ser neutralizados antes de la eliminación.

Usar indumentaria de protección y guantes adecuados, protegerse los ojos o la cara.  
No pipetear con la boca ninguna solución.  
No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en el área de trabajo.  
Lavarse bien las manos después del manejo de muestras y reactivos.  
Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos según las normas vigentes.  
Leer todas las instrucciones provistas en el kit antes de realizar la prueba.  
Respetar las instrucciones provistas en el kit durante la ejecución de la prueba.  
Respetar la fecha de caducidad del kit.  
Utilizar sólo los reactivos presentes en el kit y los aconsejados por el fabricante.  
No intercambiar reactivos que provengan de lotes diferentes.  
No utilizar reactivos que provengan de kits de otros fabricantes.

#### Advertencias y precauciones en los procedimientos de biología molecular

Los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la transcripción inversa, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos, requieren personal instruido para evitar el riesgo de resultados incorrectos, en particular a causa de la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o de la contaminación de las mismas por parte de productos de amplificación.

Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación o para la amplificación / detección de los productos de amplificación. Nunca introducir un producto de amplificación en el área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos destinados para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de productos de amplificación. Nunca transferir batas, guantes e instrumentos del área de amplificación / detección de productos de amplificación al área de extracción/ preparación de las reacciones de amplificación.

Las muestras deben ser destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben ser manipuladas bajo una campana de flujo laminar. Las probetas que contengan muestras diferentes nunca deben ser abiertas al mismo tiempo. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o usar tips con filtro para aerosol. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los reactivos deben ser manipulados bajo campana de flujo laminar. Los reactivos necesarios para la amplificación deben ser preparados de manera tal que sean utilizados en una sola sesión. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o usar tips con filtro para aerosoles. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los productos de amplificación deben ser manipulados en modo de limitar al máximo su dispersión en el ambiente para evitar contaminaciones. Las pipetas utilizadas para manipular los productos de amplificación deben ser destinadas sólo a este uso.

#### Advertencias y precauciones específicas para los componentes.

Las probetas que contienen las **OligoMIX** para la **primera amplificación**, para la **segunda amplificación** y para la **amplificación de control** son desechables y por lo tanto deben utilizarse sólo una vez en reacciones de amplificación.

Con las **OligoMIX** para la **primera amplificación**, para la **segunda amplificación** y para la **amplificación de control** se deben tener en cuenta los siguientes consejos de prudencia (S):

**S 23-25.** No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evitar el contacto con los ojos.

## MUESTRAS Y CONTROLES

### Muestras

Este producto debe ser utilizado con **ADN** extraído de las siguientes muestras biológicas: sangre periférica recolectada en EDTA, sangre medular recolectada en EDTA o citrato de sodio y muestras de biopsias frescas y congeladas.

Sangre periférica recolectada en EDTA y sangre medular recolectada en EDTA o citrato de sodio

La sangre periférica recolectada en EDTA o sangre medular recolectada en EDTA o citrato de sodio destinada a la extracción del ADN debe recolectarse según las indicaciones del laboratorio, transportarse a +2° / +8°C y conservarse a +2° / +8°C por un máximo de tres días.

No congelar la sangre periférica o medular para evitar la pérdida de ADN.

Las instrucciones para la extracción del ADN están incluidas en los Manuales de instrucciones de uso de los kit «**EXTRAcell**».

Muestras de biopsias frescas y congeladas

Las muestras de biopsias frescas destinadas a la extracción de ADN deben ser extraídas según las indicaciones del laboratorio, transportadas a +2° / +8° C y conservadas a +2° / +8° C por un máximo de cuatro horas, o bien conservarse congeladas a -20° C por un máximo de treinta días o a -70°C por tiempos más prolongados.

Se aconseja subdividir las muestras en fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> para conservarlas congeladas evitando someterlas a repetidos ciclos de congelación/ descongelación.

Las instrucciones para la extracción del ADN están incluidas en los Manuales de instrucciones de uso de los kit «**EXTRAffin**».

### Sustancias interferentes

El ADN extraído de la muestra de partida no debe contener heparina o hemoglobina, para evitar fenómenos de inhibición y la aparición de frecuentes resultados no válidos.

No son disponibles datos referidos a eventuales fenómenos de inhibición por parte de fármacos antibióticos, antivirales, quimioterápicos o inmunosupresores.

### Controles de amplificación

Es absolutamente necesario confirmar cada una de las sesiones de amplificación preparando una reacción de control negativo y una reacción de control positivo.

Para el control negativo utilizar agua bidestilada estéril (no provista en el kit) agregándola a la reacción en lugar del ADN obtenido de la muestra.

Para el control positivo utilizar el ADN obtenido de una muestra positiva ya testada o bien el «**BCL2 - Positive Control**».

### Controles de calidad

Se aconseja confirmar todo el procedimiento de análisis de cada una de las sesiones, extracción y amplificación, utilizando una muestra negativa y una muestra positiva ya testadas o del material de referencia calibrado.

**PROCEDIMIENTO**

**Programación del ciclo térmico**

(A realizarse en el área de amplificación / detección de productos de amplificación)

Antes de iniciar la sesión es necesario:

- controlar que el bloqueo térmico del termostato programable (thermal - cycler) sea compatible con el formato de las **probetas «monotest»** provistos en el kit (probetas de 0,2 mL);
- tomando como referencia la documentación del equipo, verificar la modalidad de control de la temperatura que el thermal - cycler adopta para la ejecución del ciclo térmico;
- cuando sea posible, seleccionar la modalidad de **regulación de la temperatura directamente en el bloque térmico** (por ejemplo thermal - cycler Hybaid™ o Eppendorf™);
- cuando no sea posible (por ejemplo thermal - cycler GeneAmp PCR System de Applied Biosystems™), utilizar la modalidad de control de la temperatura predefinida;
- cuando sea necesario, programar en el thermal - cycler el volumen de reacción de **100 µL**;
- programar en el thermal - cycler los parámetros del ciclo térmico descritos en las tablas siguientes.

Ciclo térmico de la primera amplificación		
Número de ciclos	Temperaturas	Tiempos
1 ciclo	95° C	4 min.
35 ciclos	95° C	1 min.
	60° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 ciclo	72° C	5 min.

Ciclo térmico de la segunda amplificación		
Número de ciclos	Temperaturas	Tiempos
1 ciclo	95° C	2 min.
30 ciclos	95° C	1 min.
	60° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 ciclo	72° C	5 min.

**Preparación de la primera amplificación**

(A realizarse en el área de extracción / preparación de la reacción de amplificación)

Cada muestra requiere la utilización de un tubo. El kit permite efectuar 25 reacciones MBR, 25 reacciones mcr, 25 reacciones ABL, controles positivos y negativos incluidos. Para una sesión la cantidad mínima de reacciones es nueve: tres reacciones MBR (control positivo, control negativo y muestra en examen), tres reacciones mcr (ídem a la anterior), tres reacciones ABL (ídem a la anterior).

Antes de iniciar la sesión es necesario:

- descongelar las muestras a analizar, el «**BCL2 - Positive Control**», centrifugarlos durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido y mantenerlos en hielo;
- descongelar una **probeta «monotest» AZUL (MBR)** por cada una de las muestras a analizar, una para el control negativo y una para el control positivo, centrifugarlas\* durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido; marcarlas de manera reconocible con un rotulador indeleble y mantenerlas en hielo.
- descongelar una **probeta «monotest» NEUTRA (mcr)** por cada una de las muestras a analizar, una para el control negativo y una para el control positivo, centrifugarlas\* durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido; marcarlas de manera reconocible con un rotulador indeleble y mantenerlas en hielo.
- descongelar una **probeta «monotest» AMARILLA (ABL)** por cada una de las muestras a analizar, una para el control negativo, centrifugarlas\* durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido; marcarlas de manera reconocible con un rotulador indeleble y mantenerlas en hielo.

\*Nota: Las **probetas «monotest»** son del tipo "de pared delgada" y deben manipularse con atención para evitar su rotura. Los centrifugados deben efectuarse con los reductores correspondientes cuando sea necesario y según las modalidades establecidas por este manual de instrucciones de uso.

- extraer la «**DNA pol. 2U / µL**», centrifugarla durante 5 segundos para obtener el contenido en el fondo y mantenerla en hielo;
- diluir la enzima «**DNA pol. 2U / µL**» como se describe en la tabla siguiente con agua bidestilada estéril. Preparar un volumen de enzima diluida suficiente para todas las reacciones **MBR, mcr, ABL** (controles incluidos) más una, para contar con un margen de seguridad. La enzima diluida **no** puede conservarse.

Número de reacciones	DNA pol. 2U / µL	Agua	Volumen total
4	2,0 µL	18,0 µL	20 µL
5	2,5 µL	22,5 µL	25 µL
6	3,0 µL	27,0 µL	30 µL
7	3,5 µL	31,5 µL	35 µL
8	4,0 µL	36,0 µL	40 µL
9	4,5 µL	40,5 µL	45 µL
10	5,0 µL	45,0 µL	50 µL
11	5,5 µL	49,5 µL	55 µL
12	6,0 µL	54,0 µL	60 µL
13	6,5 µL	58,5 µL	65 µL
14	7,0 µL	63,0 µL	70 µL
15	7,5 µL	67,5 µL	75 µL
16	8,0 µL	72,0 µL	80 µL
17	8,5 µL	76,5 µL	85 µL
18	9,0 µL	81,0 µL	90 µL
19	9,5 µL	85,5 µL	95 µL
20	10,0 µL	90,0 µL	100 µL
21	10,5 µL	94,5 µL	105 µL

1. Agregar a cada una de las **probetas «monotest» AZULES (MBR) NEUTRAS (mcr) y AMARILLAS (ABL) 5 µL** de ADN polimerasa termoestable diluida (1 U).
2. Agregar a cada una de las **probetas «monotest» AZULES, NEUTRAS y AMARILLAS 5 µL** de ADN obtenido. Proceder de igual manera con el control negativo y con el control positivo.
3. Transferir las **probetas «monotest» AZULES, NEUTRAS y AMARILLAS** en el thermal - cycler al área de amplificación / detección de los productos de amplificación e iniciar el ciclo térmico de la primera amplificación.

**Preparación de la segunda amplificación**

(A realizarse en el área de extracción / preparación de la reacción de amplificación)

Antes de iniciar la sesión es necesario:

- extraer la «**DNA pol. 2U / µL**», centrifugarla durante 5 segundos para obtener el contenido en el fondo y mantenerla en hielo;
- descongelar tantas **probetas «monotest» ROJAS (MBR)** como sean las azules, centrifugarlas\* durante 5 segundos para obtener el contenido en el fondo; marcarlas de manera reconocible con un rotulador indeleble y mantenerlas en hielo.
- descongelar tantas **probetas «monotest» VERDES (mcr)** como sean las neutras, centrifugarlas\* durante 5 segundos para obtener el contenido en el fondo; marcarlas de manera reconocible con un rotulador indeleble y mantenerlas en hielo.

\*Nota: Las **probetas «monotest»** son del tipo "de pared delgada" y deben manipularse con atención para evitar su rotura. Los centrifugados deben efectuarse con los reductores correspondientes cuando sea necesario y según las modalidades establecidas por este manual de instrucciones de uso.

- diluir la enzima «DNA pol. 2U / µL» como se describe en la tabla anterior con agua bidestilada estéril. Preparar un volumen de enzima diluida suficiente para todas las reacciones MBR y mcr previstas (controles incluidos) más una, para contar con un margen de seguridad. La enzima diluida no puede conservarse.

4. Agregar a cada una de las probetas «monotest» ROJAS (MBR) y VERDES (mcr) 5 µL de ADN polimerasa termoestable diluida (1 U).
5. Agregar a cada una de las probetas «monotest» ROJAS (MBR) 1 µL de producto de la primera amplificación de la correspondiente probeta «monotest» AZUL (MBR).
6. Agregar a cada una de las probetas «monotest» VERDES (mcr) 1 µL de producto de la primera amplificación de la correspondiente probeta «monotest» NEUTRA (mcr).

**Nota:** El producto de la primera amplificación tiene la capacidad de contaminar las pruebas siguientes. Aislar el producto residual de la primera amplificación y cambiar los guantes al final de esta fase del procedimiento.

7. Transferir las probetas «monotest» ROJAS y VERDES en el thermal - cycler al área de amplificación / detección de los productos de amplificación e iniciar el ciclo térmico de la segunda amplificación.

**Nota:** El producto de reacción puede conservarse a -20° C por un período máximo de un mes.

**Revelación del producto específico de amplificación.**

(A realizarse en el área de amplificación / detección de productos de amplificación)

El producto específico de la segunda amplificación puede detectarse e identificarse mediante separación electroforética utilizando un gel de agar al 4% con bromuro de etidio 1 µg / mL en tampón TAE 1x (20 mM Tris base, 20 mM TRIS acetato, 1 mM EDTA disódico), como en el producto «ELECTROFORESI 3».

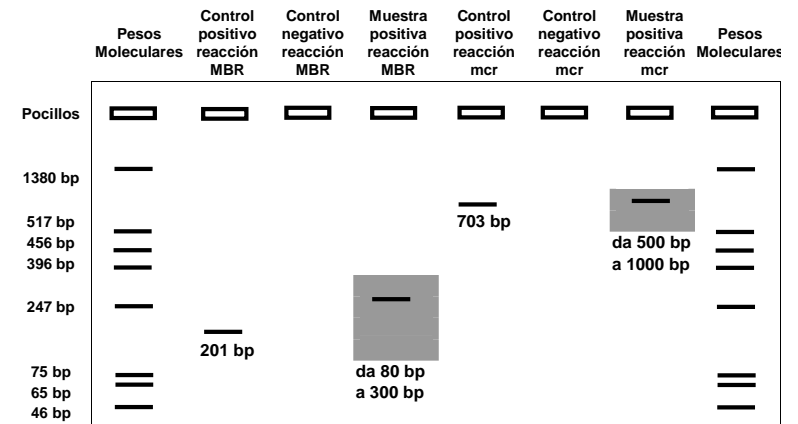
Los productos específicos de la segunda amplificación MBR tienen dimensiones: **de 80 a 300 bp**

Los productos específicos de la segunda amplificación mcr tienen dimensiones de: **de 500 a 1000 bp**

El producto específico de la amplificación ABL tiene dimensiones de: **715 bp**

**Nota:** El producto de la segunda amplificación tiene la capacidad de contaminar las pruebas siguientes. Aislar el producto residuo de la segunda amplificación y los desechos producidos en la fase de detección.

A título de ejemplo, se presenta a continuación un esquema que representa el resultado de la separación electroforética de los productos de la segunda amplificación MBR y mcr.



**Nota:** Debido a una homología a veces presente en la región J del gen IgH es posible observar, junto al producto específico de la segunda amplificación MBR o mcr, un producto adicional de amplificación de dimensiones superiores a aproximadamente 500 bp.

A título de ejemplo, se muestra a continuación un esquema que representa el resultado de la separación electroforética de los productos de la amplificación ABL.



Es absolutamente necesario confirmar la identidad del producto de la segunda amplificación de una muestra comparando su migración en gel con la migración de un marker de peso molecular y con la migración del producto de la segunda amplificación del control positivo.

La eventual presencia de productos inespecíficos de dimensiones diferentes de las de los productos específicos de la segunda amplificación de una muestra no tiene significado alguno respecto de la búsqueda del ADN de los reordenamientos MBR y mcr y del ADN del gen ABL.

**Interpretación de los resultados**

Los resultados de las reacciones de control negativo y de control positivo son utilizados para convalidar la sesión de amplificación como se describe en las tablas siguientes:

<b>Amplificación de los controles negativos</b>	<b>Amplificación</b>
<b>Producto específico MBR, mcr y ABL</b>	
<b>AUSENTE</b>	<b>CORRECTA</b>
<b>Amplificación de los controles positivos</b>	<b>Amplificación</b>
<b>Producto específico MBR y mcr</b>	
<b>PRESENTE</b>	<b>CORRECTA</b>

Si el producto específico de amplificación está presente en una de las reacciones de control negativo, ha ocurrido un problema en la fase de amplificación (contaminación) que pueden causar falsos positivos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir de la fase de amplificación.

Si el producto específico de amplificación está ausente en una de las reacciones de control positivo, ha ocurrido un problema en la fase de amplificación (amplificación no eficiente o ausente) que pueden causar falsos negativos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir de la fase de amplificación.

Este kit tiene capacidad para detectar una cantidad mínima de 10 copias de ADN de los reordenamientos MBR o mcr por reacción de amplificación (límite de detección del producto, ver apartado Características de las prestaciones en la pág. 14).

Los resultados de las reacciones referidas a las muestras que se analizan se utilizan para evaluar la presencia del ADN de MBR y mcr, como se describe en la tabla siguiente:

<b>Amplificación de la muestra</b>		<b>Idoneidad de la muestra</b>	<b>Resultado de la prueba</b>	<b>ADN de MBR o mcr</b>
<b>Producto específico MBR o mcr</b>	<b>Producto específico ABL</b>			
<b>AUSENTE</b>	<b>AUSENTE</b>	<b>no apta</b>	<b>no válido</b>	<b>-</b>
	<b>PRESENTE</b>	<b>apta</b>	<b>válido, negativo</b>	<b>NO DETECTADO</b>
<b>PRESENTE</b>	<b>AUSENTE</b>	<b>apta*</b>	<b>válido, positivo</b>	<b>PRESENTE</b>
	<b>PRESENTE</b>	<b>apta</b>	<b>válido, positivo</b>	<b>PRESENTE</b>

Si en las reacciones de una muestra están ausentes tanto el producto específico de amplificación de MBR y mcr como el del gen ABL de la amplificación de control, ha ocurrido un problema en la fase de amplificación (amplificación no eficiente o ausente) o durante la fase de extracción (ausencia de ADN, presencia de inhibidores o muestra de partida con un número de células insuficiente) que puede provocar falsos negativos. La muestra no es apta, la prueba no es válida y debe repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si en la reacción de una muestra está ausente el producto específico de amplificación de MBR y mcr y está presente el del gen ABL de la amplificación de control, el ADN de los reordenamientos MBR y mcr no ha sido detectado en el ADN extraído de la muestra, pero no se puede excluir que el ADN de los reordenamientos MBR y mcr esté presente con un título inferior al límite de detección del producto (límite de detección del producto, ver apartado Características de las prestaciones en la página 14). En este caso el resultado sería un falso negativo.

Los resultados obtenidos con este producto deben interpretarse considerando todos los datos clínicos y los demás exámenes de laboratorio correspondientes al paciente.

**\*Nota:** Cuando en una reacción de amplificación está presente el producto específico de amplificación de los reordenamientos MBR o mcr y el del gen ABL de la amplificación de control está ausente, la muestra de todas maneras es apta y el resultado positivo de la prueba es válido. En efecto, la reacción de amplificación del gen ABL tiene una eficiencia menor (single round) de la reacción de amplificación de MBR y mcr (nested).

**Cálculo de los límites de detección**

El límite de detección, cuando se utiliza un método particular de extracción y referido a una unidad de medida específica, puede calcularse a partir del límite de detección de la reacción de amplificación según esta fórmula:

$$\text{Límite de detección} = Fe \times Ee \times Fa \times 10 \text{ copias ADN /reacción}$$

**Fe** es la relación entre la unidad de medida de referencia y la muestra utilizada en la extracción, por ejemplo:

<b>Extracción</b>	<b>unidad de medida</b>	<b>muestra en extracción</b>	<b>Fe</b>
«EXTRAcCell»	copias ADN / 1.000.000 células	500.000 células	$Fe = 10^6 \text{ c.} / 5 \times 10^5 \text{ c.} = 2$

**Ee** es la inversa de la eficiencia de la extracción, por ejemplo:

<b>Extracción</b>	<b>eficiencia de la extracción</b>	<b>Ee</b>
«EXTRAcCell»	eficiencia aproximada 100%, es decir 1,0	$Ee = 1 / 1,0 = 1$

**Fa** es la relación entre el volumen del ADN extraído y el volumen usado en la reacción de amplificación, por ejemplo:

<b>Extracción</b>	<b>volumen del ADN extraído</b>	<b>volumen en reacción</b>	<b>Fa</b>
«EXTRAcCell»	100 µL	5 µL	$Fa = 100 \mu\text{L} / 5 \mu\text{L} = 20$

Quando se utilizan los kits de extracción de ELITechGroup S.p.A. la fórmula es:

<b>Extracción</b>	<b>Límites de detección</b>
«EXTRAcCell»	<b>Límite de detección = 400 copias ADN / 1.000.000 células</b>

**LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

Utilizar con este producto sólo el ADN extraído de las siguientes muestras biológicas: sangre periférica recolectada en EDTA, sangre medular recolectada en EDTA o citrato de sodio, muestras de biopsias frescas y congeladas.

No utilizar con este producto el ADN extraído de muestras heparinizadas: la heparina inhibe la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos y produce resultados no válidos.

No utilizar con este producto ADN extraído contaminado con hemoglobina: estas sustancias pueden inhibir las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos y pueden causar resultados no válidos.

No son disponibles datos referidos a eventuales fenómenos de inhibición por parte de fármacos antibióticos, antivirales, quimioterápicos o inmunosupresores.

Los resultados obtenidos con este producto dependen de la correcta recolección, transporte, conservación y preparación de las muestras; por lo tanto es necesario tener la precaución durante estas fases y seguir atentamente las instrucciones provistas con los productos para la extracción de los ácidos nucleicos con el fin de evitar resultados incorrectos.

La metodología de amplificación nested de los ácidos nucleicos utilizada en este producto, debido a su alta sensibilidad analítica, está sujeta a contaminación por parte de muestras clínicas positivas para MBR y mcr, de los controles positivos y de los mismos productos de la reacción de amplificación. Las contaminaciones llevan a resultados falsos positivos. Las modalidades de realización del producto son capaces de reducir las contaminaciones; sin embargo, estos fenómenos pueden evitarse sólo con una buena práctica de las técnicas de laboratorio y siguiendo atentamente las instrucciones provistas en este Manual.

Este producto requiere personal instruido para la manipulación de muestras biológicas capaces de transmitir infecciones y de preparados químicos clasificados como peligrosos, para evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario u otras personas.

Este producto requiere indumentaria y áreas de trabajo adecuadas para la manipulación de muestras biológicas capaces de transmitir infecciones y de preparados químicos clasificados como peligrosos, para evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario u otras personas.

Este producto requiere personal capacitado en los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos para evitar resultados incorrectos.

Este producto requiere áreas separadas para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de los productos de amplificación para evitar resultados falsos positivos.

Este producto requiere el uso de indumentaria de trabajo e instrumentos destinados a la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / revelación de los productos de amplificación para evitar resultados falsos positivos.

Un resultado negativo obtenido con este producto indica que el ADN de los reordenamientos MBR y mcr no ha sido detectado en el ADN extraído de la muestra, pero no se puede excluir que el ADN de los reordenamientos MBR y mcr esté presente con un título inferior al límite de detección del producto (límite de detección del producto, ver apartado Características de las prestaciones en la página 14); en este caso el resultado sería un falso negativo.

Como para cualquier otro dispositivo diagnóstico, los resultados obtenidos con este producto deben ser interpretados considerando todos los datos clínicos y otros exámenes de laboratorio correspondientes al paciente.

Como para cualquier otro dispositivo de diagnóstico, existe un riesgo latente de obtener resultados no válidos, falsos positivos y falsos negativos con este producto. Dicho riesgo latente no puede ser eliminado ni reducido ulteriormente. Este riesgo latente en situaciones particulares, puede contribuir a decisiones equivocadas también con consecuencias graves para el paciente.

**CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES**

**Sensibilidad analítica: límite de detección de las MBR OligoMIX y mcr OligoMIX**

La sensibilidad analítica de estas OligoMIX permite identificar la presencia de aproximadamente 10 moléculas de ADN blanco en los 5 µL de ADN extraído agregados a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de la prueba, como límite de detección, ha sido determinada utilizando como material de referencia dos ADN plasmídicos que contienen el producto de amplificación cuya concentración inicial ha sido medida espectrofotométricamente (pMBR y pmcr).

El ADN plasmídico pMBR ha sido diluido en un título de 10 copias / 5 µL y la dilución se empleó en dos repeticiones en seis sesiones diferentes para realizar el procedimiento de amplificación nested con MBR OligoMIX producto ELITechGroup S.p.A.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	Nº de sesiones	Nº de repeticiones	Positivas MBR	Negativas MBR
10 copias pMBR	6	2	12	0

El ADN plasmídico pmcr ha sido diluido en un título de 10 copias / 5 µL y la dilución se empleó en dos repeticiones en seis sesiones diferentes para realizar el procedimiento de amplificación nested con mcr OligoMIX, producto ELITechGroup S.p.A.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	Nº de sesiones	Nº de repeticiones	Positivas mcr	Negativas mcr
10 copias pmcr	6	2	12	0

**Sensibilidad analítica: límite de detección de ABL OligoMIX**

La sensibilidad analítica de esta OligoMIX permite identificar la presencia de aproximadamente 100 moléculas de ADN blanco en los 5 µL de ADN agregados a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica del control de idoneidad de la muestra, como límite de detección, ha sido determinada utilizando como material de referencia ADN genómico humano, cuya concentración inicial ha sido medida espectrofotométricamente.

El ADN genómico humano ha sido diluido en un título de 5 ng / 5 µL y la dilución se empleó en dos repeticiones en seis sesiones diferentes para realizar el procedimiento de amplificación single round con ABL OligoMIX, producto ELITechGroup S.p.A.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	Nº de sesiones	Nº de repeticiones	Positivas ABL	Negativas ABL
5 ng ADN genómico humano	6	2	12	0

**Sensibilidad diagnóstica: eficiencia de detección en eventuales polimorfismos**

La sensibilidad de diagnóstico de la prueba, como eficiencia de detección en eventuales polimorfismos, ha sido evaluada por comparación de secuencias con bases de datos nucleotídicas.

El análisis de alineación de las regiones elegidas para la hibridación de los oligonucleótidos primers para el reordenamiento MBR de las **MBR OligoMIX**, con las secuencias disponibles en la base de datos de las regiones genómicas del reordenamiento BCL2-IgH ha demostrado su conservación y la ausencia de mutaciones significativas.

El análisis de alineación de las regiones elegidas para la hibridación de los oligonucleótidos primers para el reordenamiento mcr de las **mcr OligoMIX**, con las secuencias disponibles en la base de datos de las regiones genómicas del reordenamiento BCL2-IgH ha demostrado su conservación y la ausencia de mutaciones significativas.

El análisis de alineación de las regiones elegidas para la hibridación de los oligonucleótidos primers para el gen ABL de las **ABL OligoMIX**, con las secuencias disponibles en la base de datos de la región del gen ABL ha demostrado su conservación y la ausencia de mutaciones.

**Especificidad diagnóstica: muestras negativas**

La especificidad de diagnóstico de la prueba, como confirmación de muestras negativas, ha sido verificada efectuando el análisis de muestras de ADN genómico humano normal.

La especificidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia ADN genómico humano negativo para el reordenamiento MBR y mcr, cuya concentración inicial ha sido medida espectrofotométricamente.

El ADN genómico humano ha sido diluido en una concentración de 500 ng / 5 µL y la dilución se empleó en dos repeticiones en seis sesiones diferentes para realizar el procedimiento de amplificación nested con MBR OligoMIX producto ELITechGroup S.p.A.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	Nº de sesiones	Nº de repeticiones	Positivas MBR	Negativas MBR
500 ng ADN genómico	6	2	0	12

El ADN genómico humano ha sido diluido en una concentración de 500 ng / 5 µL y la dilución se empleó en dos repeticiones en seis sesiones diferentes para realizar el procedimiento de amplificación nested con mcr OligoMIX producto ELITechGroup S.p.A.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	Nº de sesiones	Nº de repeticiones	Positivas mcr	Negativas mcr
500 ng ADN genómico	6	2	0	12

**Especificidad analítica: marcadores potencialmente interferentes**

La especificidad analítica de la prueba, como reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes, ha sido evaluada por comparación de secuencias con bases de datos nucleotídicos.

El examen de alineación de las regiones elegidas para la hibridación de los oligonucleótidos primers para el reordenamiento MBR de las **MBR OligoMIX** con las secuencias disponibles en la base de datos de regiones genómicas humanas diferentes de las regiones genómicas MBR e IgH, entre ellas las del genoma humano completo, ha demostrado la especificidad del sistema de amplificación.

El examen de alineación de las regiones elegidas para la hibridación de los oligonucleótidos primers para el reordenamiento mcr de las **mcr OligoMIX** con las secuencias disponibles en la base de datos de regiones genómicas humanas de las regiones genómicas mcr e IgH, entre ellas las del genoma humano completo, ha demostrado la especificidad del sistema de amplificación.

El examen de alineación de las regiones elegidas para la hibridación de los oligonucleótidos primers para el gen ABL de las **ABL OligoMIX** con las secuencias disponibles en la base de datos de regiones genómicas humanas diferentes de los genes humanos ABL, entre ellas las del genoma humano completo, ha demostrado la especificidad del sistema de amplificación.

**Nota:** Los datos y los resultados completos de las pruebas realizadas para evaluar las características de las prestaciones del producto están señaladas en la Sección 7 del Fascículo Técnico del Producto "BCL2 oligomix Alert kit", FTP BANG08.

**BIBLIOGRAFÍA**

J. G. Gribben et al. (1994) *Blood* **12**: 3800 - 3807

**PROBLEMAS Y SOLUCIONES**

**Producto específico de amplificación presente en la reacción de control negativo**

Causas posibles	Soluciones
Error durante la dispensación del ADN extraído.	Abrir una probeta a la vez, evitar esparcir el contenido de la probeta, cambiar siempre de tip.
Error durante la dispensación del producto de primera amplificación.	Abrir una probeta a la vez, evitar esparcir el contenido de la probeta, cambiar siempre de tip.
Contaminación de los reactivos preparados para la sesión.	Seguir atentamente la dilución y la dispensación de la enzima, cambiar siempre de tip.
Contaminación del agua estéril para la dilución de la enzima.	Utilizar una nueva alícuota de agua estéril.
Contaminación de stock de enzima.	Utilizar una nueva alícuota de la enzima.
Contaminación del área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.	Limpia superficies e instrumentos con detergentes acuosos, lavar batas, sustituir probetas y tips en uso.

**Producto específico de amplificación ausente en la reacción de Positive Control**

Causas posibles	Soluciones
Enzima demasiado diluida o error durante la dispensación de la enzima.	Volver a controlar los cálculos de dilución, seguir atentamente la dispensación de la enzima y mezclar de manera adecuada.
Error durante la dispensación del control positivo.	Seguir atentamente la dispensación del control positivo.
Degradación del control positivo.	Utilizar una nueva alícuota de control positivo.
Error de programación del ciclo térmico.	Controlar el ciclo térmico programado en el thermal - cycler.
Error durante la dispensación del producto de primera amplificación.	Extraer y distribuir prestando atención el producto de la primera amplificación en la segunda amplificación.
Error durante la dispensación del producto de la segunda amplificación en el gel.	Prestando atención, cargar el producto de la segunda amplificación en el gel.

**Productos específicos de amplificación presentes en las reacciones de las muestras**










Causas posibles	Soluciones
Enzima demasiado concentrada.	Volver a controlar los cálculos de dilución de la enzima.
Tiempos de preparación de la primera reacción de amplificación demasiado largos.	Mantener en hielo las probetas a las que ya se les ha agregado el ADN extraído hasta que sean transferidas al thermal - cycler.
Error de programación del ciclo térmico.	Controlar el ciclo térmico programado en el thermal - cycler.
Exceso de ADN extraído en la reacción.	Evaluar la concentración del ADN extraído, no agregar más de 1 µg de ADN por reacción.



Producto específico de amplificación ausente en la reacción ABL de control de las muestras

Causas posibles	Soluciones
Presencia de heparina en la muestra de sangre entera.	Se debe utilizar EDTA o citrato de sodio como anticoagulante para las muestras de sangre.
Error en la conservación de la muestra de sangre.	La sangre debe ser tratada, para la extracción del ADN, pocas horas después de su recolección y nunca debe congelarse.
Error en la fase de extracción.	Controlar las operaciones de extracción. Preparar y realizar la extracción siguiendo con atención las instrucciones.
Degradación de la muestra extraída.	La extracción del ADN debe ser realizada con material y reactivos sin la presencia de ADNasa. El ADN extraído debe ser conservado a -20°C o a -70°C.
Error en la fase de amplificación.	Ver las sugerencias del apartado "Producto específico de amplificación ausente en la reacción de control positivo".

**SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS**

-  Número de catálogo.
-  Límite superior de temperatura.
-  Código de lote.
-  Utilizar antes del último día del mes.
-  Dispositivo médico diagnóstico *in vitro*.
-  Conforme a los requisitos de la Directiva Europea 98\79\CE correspondiente a los dispositivos médicos diagnósticos *in vitro*.
-  Contenido suficiente para "N" test.
-  Atención, consultar las instrucciones de uso.
-  Fabricante.

La adquisición de este producto permite al comprador utilizarlo para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos con el fin de proveer servicios de diagnóstico humano *in vitro*. Este derecho es otorgado sólo si el producto provisto es utilizado junto a un producto con licencia para el "Positive Control" y para la detección, de ELITechGroup S.p.A. Por medio de la adquisición no se otorga ningún derecho general u otra licencia de tipo diferente de este derecho específico de uso.