

Mentype[®] AMLplex^{QS}

Instrucciones de uso

Detección de alteraciones cromosómicas de la leucemia mieloide aguda

Diagnósticos en vitro



AMLIFU01v2es
Agosto 2019

45-31220-0010

45-31220-0025

45-31220-0100

45-31220-0400



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 Dresden
Germany

Made in Germany

La empresa Biotype GmbH desarrolla, produce y distribuye aplicaciones basadas en PCR para diagnósticos médicos.

Nuestros kits de ensayo Mentype® garantizan los máximos estándares de calidad.

Estamos a su entera disposición para más información y sugerencias. Póngase en contacto con nosotros o visite nuestro sitio web www.biotype.de.

Índice de contenidos

1. Uso previsto	5
2. Información básica	5
3. Descripción del producto Mentype® AMLplex^{QS}	5
3.1 Instrumentos	7
3.2 Tipo de muestras	7
4. Advertencias e indicaciones de seguridad	8
4.1 Control de calidad	8
5. Material incluido	9
5.1 Contenido del kit	9
5.2 Información para pedidos	9
5.3 Otros reactivos y equipos necesarios (no incluidos en el kit)	9
6. Almacenamiento	11
7. Etapas de trabajo de Mentype® AMLplex^{QS}	12
7.1 Preparación de las muestras y el volumen de aplicación de ADNc	12
7.1.1 Aislamiento de ARN	12
7.1.2 Transcripción de RNA a ADNc	12
7.1.3 Uso del ADNc molde.....	12
7.2 Preparación de la mezcla maestra	13
7.2.1 Control positivo	13
7.2.2 Control negativo	14
7.3 Volumen de reacción	15
8. Programa PCR y amplificación.....	16
9. Electroforesis capilar en gel.....	17
9.1 Electroforesis en el sistema ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	17
9.1.1 Creación de la matriz.....	17
9.1.2 Preparación de las muestras.....	22
9.1.3 Configuración del software Data Collection	23
9.2 Electroforesis en el ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer	23
9.2.1 Calibración espectral / Crear matriz	24
9.2.2 Preparación de las muestras.....	26
9.2.3 Configuración del software Data Collection	27
9.3 Electroforesis en ABI PRISM®3130/3130xl Genetic Analyzer	29
9.3.1 Calibración espectral / Crear matriz	30
9.3.2 Preparación de las muestras.....	33
9.3.3 Configuración del software Data Collection	34
9.4 Electroforesis con ABI PRISM®3500/3500xL Genetic Analyzer	36
9.4.1 Calibración espectral / Crear matriz	37
9.4.2 Preparación de las muestras.....	41
9.4.3 Ajustes para el análisis	41
10. Evaluación de datos.....	45

10.1 Programa y modelos de evaluación.....	45
10.2 Procedimiento de evaluación de datos	46
10.2.1 Requisitos generales mínimos para la evaluación de datos	46
10.2.2 Control del estándar de tamaño Size Standard 550 (BTO).....	47
10.2.3 Comprobación de la escalera alélica /Allelic Ladder	47
10.2.4 Comprobación del Control cDNA KAS-1.....	50
10.2.5 Comprobación del control negativo	50
10.2.6 Evaluación de los datos de las muestras	51
11. Troubleshooting.....	53
11.1 Límite de detección	53
11.2 Superposición (Pull-up Peaks)	53
11.3 Adherencia de nucleótidos independiente de la plantilla	53
11.4 Artefactos	54
11.5 Influencia del tipo de polímero	54
12. Información para pedidos	55
13. Referencias	56
14. Marcas y exención de responsabilidad	57
15. Símbolos	58
A Validación analítica.....	59
A a) Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas de carga 59	
A b) Verificación de la fidelidad de medición	59
A c) Verificación de la especificidad analítica	60
A c) a) Verificación de la especificidad analítica en base a ADNc negativo pretipificado 60	
A c) b) Verificación de la especificidad analítica en base a ADNc positivo pretipado ...	60
A d) Verificación de la sensibilidad analítica	61
A e) Verificación de diferentes termocicladores de PCR	61
A f) Verificación de la influencia de diferentes temperaturas de alineamiento en la PCR61	
A g) Verificación de diferentes cargas tampón de PCR	62
A h) Caducidad después de abierto	62
B Datos de rendimiento clínico.....	63
B a) Toma de muestras, aspectos éticos y regulatorios	63
B b) Ensayo comparativo.....	63
B c) Extracción de ADN y purificación	63
B d) Resultados.....	63
B e) Bibliografía sobre biomarcadores y sus secuencias de ADN	65

Mentype® AMLplex^{QS}

1. Uso previsto

El kit Mentype® AMLplex^{QS} está destinado a la detección cualitativa de 34 variantes transcripcionales que pueden generarse en determinados casos de leucemia mieloica aguda (AML) por translocaciones cromosómicas (mutaciones somáticas) bajo la influencia de 11 fusiones génicas diferentes.

Las aplicaciones de Mentype® AMLplex^{QS} están destinadas al uso exclusivamente profesional en laboratorios especializados. El personal debe estar capacitado para el uso de técnicas PCR y de diagnósticos en vitro.

2. Información básica

La detección de aberraciones cromosómicas específicas tiene una gran importancia como pronóstico y, por lo tanto, son indispensables en el diagnóstico de leucemias agudas. La identificación de las translocaciones genéticas específicas permite clasificar los subtipos de leucemia para adaptar las terapias al paciente y reducir riesgos.

El kit Mentype® AMLplex^{QS} hace posible una sólida identificación, de fácil realización en las rutinas de diagnóstico, de las aberraciones cromosómicas que subyacen a la leucemia mieloica aguda (AML).

3. Descripción del producto Mentype® AMLplex^{QS}

Mentype® AMLplex^{QS} identifica mediante una fórmula multiparámetro 34 variantes de transcripciones de los siguientes genes de fusión: RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL, PICALM-MLLT10, CBFB-MYH11, DEK-NUP214, KMT2A-MLLT4, KMT2A-MLLT3, KMT2A-ELL, KMT2A-PTD, NPM1-MLF1 y PML-RARA (ver Tabla 1).

Los resultados de Mentype® AMLplex^{QS} están asegurados por dos controles internos. El control interno de PCR (Quality Sensor “control QS”) indica el éxito de la reacción de amplificación; un “control ADNc” (control ABL) se encuentra incluido en el kit para mostrar la calidad el ADNc utilizado.

El ensayo consiste en analizar la longitud de los fragmentos mediante electroforesis capilar en gel. El cebador está marcado con los colorantes fluorescentes **6-FAM, BTG o BTY**.

Tabla 1 Fusiones de genes y variantes de transcripciones que pueden ser detectadas con Mentype® **AMLplex**^{OS}

Fusión de genes	Aberración cromosómica	Variante
RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)	t(8;21) (q22;q22)	-
BCR-ABL	t(9;22) (q34;q11)	e1a3 e1a2 b3a2 b3a3 b2a2 b2a3
PICALM-MLLT10 (CALM-AF10)	t(10;11) (p13;q14)	MLLT10_240-PICALM_1987 MLLT10_240-PICALM_2092
CBFB-MYH11	inv(16) (p13;q22)	Tipo A Tipo B Tipo C Tipo D Tipo E Tipo F Tipo G Tipo H Tipo I Tipo J
DEK-NUP214 (DEK-CAN)	t(6;9) (p23;q34)	-
KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6)	t(6;11) (q27;q23)	-
KMT2A-MLLT3 (MLL-AF9)	t(9;11) (p22;q23)	6A_(THP-1) 7A_(10A) 8A_(MM6) 6B_(9B)
KMT2A-ELL (MLL-ELL)	t(11;19) (q23;p13.1)	e10e2 e10e3
KMT2A-PTD (MLL-PTD)	Partial Tandem Duplication	e9e3 e10e3 e11e3
NPM1-MLF1	t(3;5) (q25.1;q34)	-
PML-RARA	t(15;17) (q22;q21)	bcr1 (PR-L) bcr2 (PR-V) bcr3 (PR-S)

3.1 Instrumentos

Los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** han sido verificados y validados para los siguientes termocicladores de PCR:

- GeneAmp™ 9700 Silver Thermocycler (Applied Biosystems™)
- Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG)
- Biometra T1 (Analytik Jena AG)

Los kits han sido verificados y validados para los siguientes sistemas de electroforesis capilar en gel utilizando POP-4™ (Applied Biosystems™) y una longitud capilar de 36 cm; se ha verificado el uso de POP-7™:

- ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)
- ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)
- ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)

La evaluación de los datos ha sido verificada con las siguientes versiones de software:

- GeneMapper™ ID 3.2 (Applied Biosystems™)
- GeneMapper™ ID-X 1.4 (Applied Biosystems™)

El uso de los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** en otros instrumentos o con software distintos a los indicados más arriba tiene que ser verificado y validado por el usuario bajo su responsabilidad.

3.2 Tipo de muestras

Los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** han sido validados con ADNc, sintetizado a partir de ARN que fue aislado de sangre entera con citrato.

El producto Mentype® **AMLplex^{QS}** está validado para el uso de 1 µL de ADNc sintetizado a partir de 1 µg de ARN en un volumen de reacción de 20 µL. El uso de mayores cantidades de ADNc tiene que ser validado por el usuario.

4. Advertencias e indicaciones de seguridad

Este kit de ensayo contiene la siguiente sustancia potencialmente peligrosa.

Tabla 2 Componentes potencialmente peligrosos de los kits Mentyte® AMLplex^{QS}

Componente	Sustancia química	Riesgo
Mezcla de reacción A	Azida de sodio NaN ₃	Tóxico en caso de ingestión, desarrolla gases tóxicos al contacto con ácidos

Por favor, observe las hojas de datos de seguridad (SDS) de los productos Biotype® que ponemos con agrado a su disposición previa solicitud (support@biotype.de). Solicite las hojas de datos de seguridad de los reactivos que no estén incluidos en el kit de ensayo al fabricante respectivo.

Lea atentamente las instrucciones de uso antes de utilizar el producto.

Revise todos los componentes en el momento de recibir el producto y controle la cantidad, el tipo y el envasado (ver el capítulo 5.1, Contenido del **kit**), el correcto marcado, la congelación de los reactivos y el estado del embalaje de los reactivos.

Utilice guantes, bata de laboratorio y, dado el caso, protección ocular para manipular el ensayo.

Evite la contaminación de las muestras con nucleasas (DNasa / RNasa) empleando puntas de pipeta desechables sin DNasa/ RNasa con filtro absorbente de aerosoles.

Utilice zonas de trabajo separadas para la preparación de las muestras (pre-PCR), la preparación de las mezclas maestras y el tratamiento posterior y análisis de las muestras (post-PCR). Conserve los controles positivos separados físicamente de los componentes del kit.

En función de las directivas o de las disposiciones de la normativa local, nacional y/o federal, así como de organizaciones de acreditación, pueden ser necesarios controles adicionales.

No utilice los componentes del kit con la fecha de caducidad sobrepasada y no mezcle las cargas.

Deseche los residuos de las muestras y de los ensayos siguiendo las disposiciones locales de seguridad.

4.1 Control de calidad

Todo el contenido de los kits de ensayo es sometido a estrictos controles de calidad por Biotype GmbH. La calidad de los kits de ensayo es verificada de forma continua para certificar su aplicabilidad. Por favor, envíe todas sus preguntas sobre los controles de calidad a la dirección de correo electrónico support@biotype.de.

5. Material incluido

5.1 Contenido del kit

Los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** contienen los componentes siguientes en cantidad suficiente para la realización de 10, 25, 100 o 400 reacciones.

Tabla 3 Tamaños de envase y componentes de los kits Mentype® **AMLplex^{QS}**

Componente del kit / Reactivo	Volumen por tamaño de envase			
	10 reac.	25 reac.	100 reac.	400 reac.
Nuclease-free Water	1 x 1,5 mL	1 x 1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	1 x 250 µL	1 x 250 µL	1 x 500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix	1 x 25 µL	1 x 63 µL	1 x 250 µL	4 x 250 µL
MultiTaq2 DNA Polymerase	1 x 10 µL	1 x 10 µL	1 x 40 µL	1 x 160 µL
Control cDNA KAS-1	1 x 10 µL	1 x 10 µL	1 x 10 µL	1 x 10 µL
Allelic Ladder AMLplex	1 x 25 µL	1 x 25 µL	1 x 25 µL	4 x 25 µL
Size Standard 550 (BTO)	1 x 13 µL	1 x 13 µL	1 x 50 µL	1 x 200 µL

5.2 Información para pedidos

Por favor, envíe su pedido por escrito a la dirección de correo electrónico sales@biotype.de. El pedido tiene que contener los números de pedido indicados en las tablas Tabla 4 y Tabla 44, página 55.

Tabla 4 Números de pedido de los kits Mentype® **AMLplex^{QS}**

Producto	Tamaño	N° de ped.
Mentype® AMLplex^{QS}	10 reacciones	45-31220-0010
Mentype® AMLplex^{QS}	25 reacciones	45-31220-0025
Mentype® AMLplex^{QS}	100 reacciones	45-31220-0100
Mentype® AMLplex^{QS}	400 reacciones	45-31220-0400

5.3 Otros reactivos y equipos necesarios (no incluidos en el kit)

Para la calibración inicial del equipo de electroforesis capilar en gel a los colorantes fluorescentes específicos de los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** es necesario realizar una calibración espectral con el siguiente reactivo de Biotype GmbH (Tabla 5).

Tabla 5 Otros reactivos necesarios de Biotype GmbH

Reactivo	Aplicación	Tamaño	N° de ped.
Matrix Standard BT5 single	Calibración espectral del sistema de electroforesis capilar en gel (un capilar)	5 de 25 µL	00-10411-0025
Matrix Standard BT5 multi	Calibración espectral del sistema de electroforesis capilar en gel (varios capilares)	1 de 25 µL.	00-10421-0025
Matrix Standard BT5 multi	Calibración espectral del sistema de electroforesis capilar en gel (varios capilares)	2 de 25 µL.	00-10421-0050

Para la amplificación de PCR se necesitan los siguientes materiales e instrumentos:

- centrífuga de mesa con un rotor para recipientes de reacción de 2 mL
- placas de reacción de 96 pocillos o tubos de reacción de 0,2 mL; tapas o films adecuados para las placas de 96 pocillos, una centrífuga con rotor para placas de microtubos
- agitador vórtex, apto para placas de 96 pocillos o tubos de 0,2 mL
- pipetas, puntas de pipeta con filtros (desechables)
- guantes desechables sin polvo
- kit apropiado para el aislamiento de ARN (ver el capítulo 7.1.1, Aislamiento de ARN)
- instrumento adecuado para la medición cuantitativa de la concentración de ARN tras el aislamiento y la purificación (ver el capítulo 7.1.1, Aislamiento de ARN)
- kit apropiado para la sintetización de ARN en ADNc (ver 7.1.2, Transcripción de RNA a ADNc)
- bloque de hielo para la conservación temporal de la polimerasa
- termociclador de PCR apropiado (ver el capítulo 3.1, Instrumentos)
- formamidas Hi-Di™ (Applied Biosystems™)
- reactivos y consumibles para el sistema de electroforesis capilar en gel
- instrumento apropiado para la electroforesis capilar en gel (ver el capítulo 3.1, Instrumentos)

Aviso: verifique si todos los equipos están correctamente instalados, mantenidos y calibrados de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Compruebe si están disponibles todos los reactivos para la realización de la PCR y para el sistema de electroforesis capilar en gel (ver las instrucciones de uso del fabricante respectivo).

6. Almacenamiento

El envío de los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** se efectúa en hielo seco. Los componentes del kit llegan congelados. Si alguno de los componentes no está congelado a su llegada o los tubos han sufrido daños durante el transporte, consulte las medidas a tomar con Biotype GmbH (support@biotype.de).

La conservación de los componentes en almacén tiene que efectuarse a una temperatura entre -25 °C y -15 °C. El ADNc de control y los reactivos para la post-PCR (escalera alélica y estándar de tamaño de ADN BTO) deben estar separados de los reactivos para PCR.

Debe evitarse la descongelación y congelación frecuentes. No se permite sobrepasar 20 ciclos de descongelación y congelación.

Los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** tienen que estar protegidos de la luz.

La caducidad de los kits de ensayo está indicada en la etiqueta del envase.

7. Etapas de trabajo de Mentype® AMLplex^{QS}

7.1 Preparación de las muestras y el volumen de aplicación de ADNc

7.1.1 Aislamiento de ARN

La calidad del ARN aislado influye de forma decisiva sobre el rendimiento y la capacidad de todo el sistema de ensayo. Es imprescindible garantizar que el sistema empleado para el aislamiento del ARN sea compatible con la tecnología PCR.

Los siguientes kits han sido probados para el aislamiento de ARN y son aptos para la aplicación:

- RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)
- RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)

El uso de kits de aislamiento de ARN alternativos tiene que ser validado por el usuario bajo su responsabilidad.

Aviso: para la exactitud de los resultados es necesaria una cuantificación de ARN (p. ej. mediante espectroscopia ultravioleta visible UV/VIS con A260 nm y la determinación de calidad con un cociente de A260 / A280, que debería situarse entre 1,7 y 2,0).

7.1.2 Transcripción de RNA a ADNc

Tras realizar con éxito el aislamiento y la cuantificación del ARN tiene lugar la sintetización del ADNc con ayuda de los kits comerciales disponibles en el mercado. Se ha validado una reacción de transcripción con 1 µg de ARN en un volumen de reacción de 20 µL.

Los siguientes kits han sido probados para la sintetización y son aptos para la aplicación:

- High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems™)
- QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)

El uso de kits de transcripción alternativos tiene que ser validado por el usuario bajo su responsabilidad.

7.1.3 Uso del ADNc molde

El kit Mentype® AMLplex^{QS} ha sido optimizado para el uso de 1 µL de ADNc (sin diluir), preparado como se describe en el capítulo 7.1.2.

La cantidad de ADNc molde puede aumentarse para muestras de pacientes críticos. Como máximo se debería utilizar 1/10 del volumen de la reacción RT. En la solución de reacción de los kits Mentype® AMLplex^{QS} debe corregirse el volumen de agua sin nucleasas, de

modo que el volumen total de la solución para la PCR sea siempre de 25 µL. Este procedimiento tiene que ser validado por el usuario bajo su propia responsabilidad.

7.2 Preparación de la mezcla maestra

Antes de preparar la mezcla maestra es conveniente mezclar bien (en vórtex) y centrifugar brevemente (aprox. 10 seg.) todos los reactivos. Conserve el ADN polimerasa Multi Taq2 en un bloque de hielo durante la manipulación.

El volumen total de la solución para la PCR tiene que ser siempre de 25 µL.

Tenga en cuenta los controles positivos y negativos en la cantidad de reacciones de PCR a preparar. Añada a la cantidad total una o dos reacciones para compensar los errores de pipeta.

La tabla siguiente señala los volúmenes de los componentes del kit empleados con un volumen de muestra (ADNc molde) de 1,0 µL en un volumen de reacción de 25 µL.

Tabla 6 Solución de mezcla maestra para una reacción Mentype® **AMLplex^{QS}** con 1 µL de ADNc

Componente	Volumen por solución PCR
Nuclease-free Water	16,1 µL
Reaction Mix A*	5,0 µL
Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Volumen total de mezcla maestra	24,0 µL
ADNc molde	1,0 µL

* Contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.2.1 Control positivo

En primer lugar, diluya el control positivo incluido en el kit Control cDNA KAS-1 con agua sin nucleasas en la relación 250 ng/µL.

Utilice para el control positivo el Control cDNA KAS-1 diluido en lugar de 1 µL de ADNc molde del control positivo diluido. Pipetee el ADNc de control en lugar del ADNc molde en los tubos de reacción con la mezcla maestra para PCR preparada.

La tabla siguiente muestra los volúmenes de los componentes del kit empleados con 1 µL de ADNc de control y un volumen de reacción de 25 µL.

Tabla 7 Solución de mezcla maestra para una reacción Mentype® **AMLplex**^{QS} con 1 µL de control positivo

Componente	Volumen por solución PCR
Nuclease-free Water	16,1 µL
Reaction Mix A *	5,0 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Volumen total de mezcla maestra	24,0 µL
Control cDNA KAS-1	1,0 µL

* Contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.2.2 Control negativo

Como control negativo (No Template Control), pipetee en los tubos de reacción 1 µL de agua sin nucleasas, en lugar del ADNc molde, con la mezcla maestra para PCR preparada.

La siguiente tabla muestra los volúmenes de los componentes del kit utilizados con 1 µL de agua sin nucleasas y un volumen de reacción de 25 µL.

Tabla 8 Solución de mezcla maestra de control negativo para una reacción Mentype® **AMLplex**^{QS}

Componente	Volumen por solución PCR
Nuclease-free Water	16,1 µL
Reaction Mix A *	5,0 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Volumen total de mezcla maestra	24,0 µL
Agua sin nucleasas control negativo	1,0 µL

* Contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

Como muestra de control negativo se puede agregar adicionalmente un ADNc negativo ya conocido para las fusiones genéticas y translocaciones de detección. Esa debe ser procesada como una muestra normal y aplicada en la PCR como reacción extra.

7.3 Volumen de reacción

Pipetee 24 μL de la mezcla maestra de PCR en los recipientes de reacción o en la placa multipocillos. Añada luego 1 μL del ADNc o 1 μL del control positivo o negativo.

Tras el pipeteado hay que cerrar los tubos de reacción o las placas multipocillos. Mezcle y centrifuge brevemente los preparados para la reacción y colóquelos a continuación en el termociclador de PCR para la amplificación.

8. Programa PCR y amplificación

Se debería ejecutar un ciclo **"hot start"** con el fin de activar la ADN polimerasa Multi Taq2 y evitar la formación de productos inespecíficos de la amplificación.

Para determinar la cantidad óptima de los ciclos de PCR necesarios se puede emplear el control ABL interno como referencia. El pico en el resultado no debería sobrepasar el rango de medición específico del sistema (p. ej. de 500 a 5000 RFU en el sistema ABI 3130).

Si la concentración de ADNc es demasiado baja pueden producirse errores estadísticos (Allelic Dropouts) y picos desequilibrados. Pero al incrementar la cantidad de ciclos, aumenta también la probabilidad de que se generen productos de amplificación inespecíficos.

Aviso: para un equilibrio óptimo del kit se debería ajustar las velocidades de calentamiento y enfriamiento a 4 °C/s.

Tabla 9 Parámetros de amplificación de la PCR para la realización de Mentype® **AMLplex^{QS}**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96 °C	4 min	1 ciclo (hot start para activar la ADN polimerasa Multi Taq2)
96 °C	30 s	
61 °C	120 s	22 - 28 ciclos
72 °C	75 s	
68 °C	10 min*	1 ciclo
10 °C	∞	hold

* Si se produjese un mayor porcentaje de -Adenin Peaks (-1 bp), se puede prolongar este paso a un máximo de 60 minutos.

La cantidad de ciclos depende de la cantidad de ADNc empleada y del nivel de expresión de la variante de transcripción a detectar. Se han realizado ensayos con cantidades entre 22 y 28 ciclos. Para las muestras de referencia, material de cultivo celular (tasa de expresión elevada), recomendamos reducir los ciclos de PCR a 22. Para alcanzar la sensibilidad máxima (11.1 Límite de detección) se recomienda emplear el número máximo de 28 ciclos.

9. Electroforesis capilar en gel

9.1 Electroforesis en el sistema ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer

Las instrucciones generales sobre el analizador, la creación de la matriz y el uso del software GeneMapper™ pueden consultarse en el manual correspondiente: *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer User's Manual*. A continuación se describe la electroforesis con el software GeneMapper™ ID-X.

Para combinar los cinco colorantes fluorescentes **6-FAM, BTG, BTY, BTR y BTO** está prevista la utilización de los **sets de filtros G5 (en lo que sigue nos referiremos a la matriz estándar como BT5)**.

Tabla 10 Materiales necesarios para el uso del analizador ABI 310 Genetic Analyzer

Material	Propiedad
Capilares	47 cm / 50 µm (verde)
Polímero	POP-4™ for 310 Genetic Analyzer
Tampón	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

9.1.1 Creación de la matriz

Antes de realizar el análisis de la longitud de los fragmentos con el set de filtros G5 es necesario crear una matriz con fragmentos de PCR de los cinco colorantes fluorescentes 6-FAM, BTG, BTY, BTR y BTO para el sistema analizador respectivo.

Tabla 11 Denominación de los colores de la matriz estándar BT5 single y su asignación al canal respectivo

Color	Matriz estándar
Blue (B)	6-FAM
Green (G)	BTG
Yellow (Y)	BTY
Red (R)	BTR
Orange (O)	BTO

Para crear archivos de matriz apropiados se efectúan cinco electroforesis en las mismas condiciones que rigen también para las muestras y las escaleras alélicas del kit de ensayo.

Es necesaria una electroforesis propia para cada uno de los cinco colorantes fluorescentes 6-FAM, BTG, BTY, BTR y BTO.

Tabla 12 Solución de matriz estándar BT5 single para crear una matriz en el ABI 310 Genetic Analyzers

Muestras de la matriz	Componentes	Volumen
Muestra 1	Formamidas Hi-Di™	12,0 µL
	Matriz estándar 6-FAM	1,0 µL
Muestra 2	Formamidas Hi-Di™	12,0 µL
	Matriz estándar BTG	1,0 µL
Muestra 3	Formamidas Hi-Di™	12,0 µL
	Matriz estándar BTY	1,0 µL
Muestra 4	Formamidas Hi-Di™	12,0 µL
	Matriz estándar BTR	1,0 µL
Muestra 5	Formamidas Hi-Di™	12,0 µL
	Matriz estándar BTO	1,0 µL

- Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos en un termociclador de PCR y deje enfriar las muestras a 4 °C en el aparato
- Coloque las muestras en el aparato para el análisis como se indica en las instrucciones de uso del fabricante del mismo
- Genere la lista de muestras **Sample Sheet**, **seleccione 5 Dyes** y designe las muestras

Lista de inyecciones para crear la matriz

Tabla 13 Parámetros para crear la matriz en el ABI 310 Genetic Analyzer

Parámetro	Ajuste
Module File	GS STR POP-4 (1 mL) G5
Matrix File	NONE
Size Standard*	NONE
Injection [s]	5
Injection [kV]	15.0
Run [kV]	15.0
Run [°C]	60
Run Time [min]	24

* Las matrices estándar deben prepararse siempre **sin el estándar de longitud de ADN (BTO)**

Análisis de las muestras de la matriz

- Inicie el software GeneMapper™
- **File → Add Samples to Project** (abrir carpeta de la unidad respectiva)
- Abra la carpeta de muestras en el margen izquierdo
- Marque la muestra para la matriz → **Raw Data** (en el margen derecho de la pantalla)
- Estime si se dispone de una línea base estable. Como se aprecia en la Figura 1, en cada muestra de la matriz deberían reconocerse al menos cinco picos con alturas de 1.000-4.000 RFU (eje Y) (intervalo óptimo: 2.000-4.000 RFU)

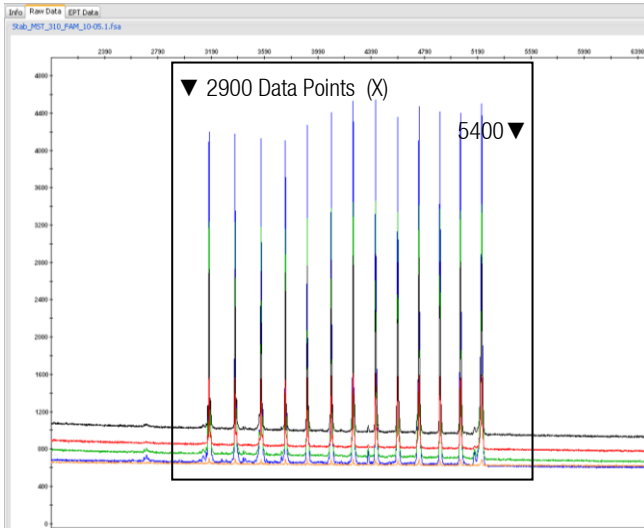


Figura 1 Electroforegrama de los datos brutos de la matriz BT5 en el ABI 310 Genetic Analyzer

- Seleccione el intervalo de análisis con una línea base estable plana
- Si la línea base es demasiado inestable, inyecte la muestra de la matriz de nuevo
- Anote los puntos de inicio y final (Data Points) del intervalo de selección, p. ej. valor de inicio 2.900, valor final 5.400
- Calcule la diferencia, p. ej. $5.400 - 2.900 = 2.500$ Data Points

Crear una matriz nueva

- **Tools** → **GeneMapper Manager** → **Matrices** → **New**
- Asignar un nombre a la matriz, por ejemplo Matrix BT5
- Importar en **Matrix Settings** las muestras para cada color (B, G, Y, R, O) (clic en el símbolo del color)

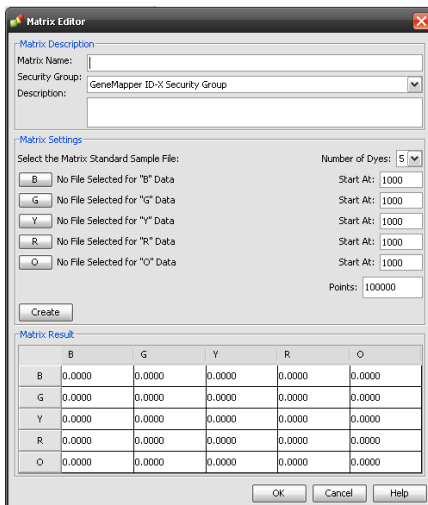


Figura 2 Selección de las muestras de la matriz con punto inicial y especificación de la diferencia

- Anotar el punto de inicio respectivo en **Start At** p. ej. 2.900
- Anotar la diferencia calculada, p. ej. 2.500 en **Points**

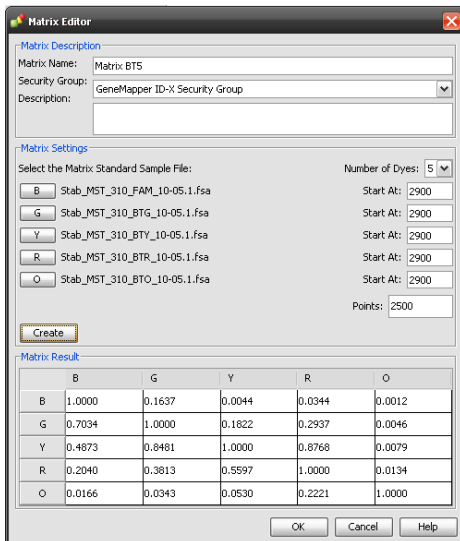


Figura 3 Archivos de la matriz creados y tamaño de fuente

- **Create** calcula la nueva matriz
- **OK** guarda la nueva matriz

Comprobación de la matriz

- Por favor, compruebe la nueva matriz con sus muestras actuales.
- **File → Add Samples to Project** (abrir carpeta de la unidad respectiva)
→ **Add Sample Files**
- Seleccione en la tabla de Sample la nueva matriz generada
- Analizar de nuevo las muestras

Con la nueva matriz no debería producirse **ninguna** superposición (Pull-up Peaks) entre los diferentes paneles de colores (B, G, Y, R, O).

9.1.2 Preparación de las muestras

Tabla 14 Solución de mezcla con estándar de tamaño y formamida para cada reacción de electroforesis capilar en gel

Componentes	Volumen por reacción
Formamidas Hi-Di™	12,0 µL
ADN estándar 550 (BTO)	0,5 µL

- Prepare 12 µL de la mezcla de Tabla 14 para todas las muestras
- Añada a la mezcla 1 µL del producto de PCR (diluido si es preciso) o de la escalera alélica en cada pocillo
- Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos en un termociclador de PCR y deje enfriar las muestras a 4 °C en el aparato
- Coloque las muestras en el aparato para el análisis como se indica en las instrucciones de uso del fabricante del mismo

La temperatura ambiente puede influir en gran medida sobre el comportamiento de los productos de PCR en el proceso y provocar picos dobles (split peaks) si la temperatura es demasiado baja. En determinadas circunstancias la temperatura afecta también a la velocidad de desarrollo de los fragmentos. Tenga en cuenta, por favor, que es necesario respetar la temperatura de trabajo recomendada por el fabricante del aparato. Las condiciones óptimas son >22 °C de temperatura ambiente.

Posibilidades para aumentar la intensidad de las señales

- Reducir los porcentajes del estándar de longitud de ADN 550 (BTO) a picos de aproximadamente 500 unidades de fluorescencia relativa (RFU)
- Purificar los productos de PCR antes del análisis

9.1.3 Configuración del software Data Collection

- Crear la lista de muestras **Sample Sheet** y asignar nombres a las muestras

Lista de inyecciones

Tabla 15 Parámetros para crear la lista de inyecciones del ABI 310 Genetic Analyzer, para el análisis de las muestras

Parámetro	Ajustes
Module File	GS STR POP-4 (1 mL) G5
Matrix File	p. ej. Matrix BT5
Size Standard	p. ej. SST-BTO_60-550bp
Injection [s]*	5
Injection [kV]	15.0
Run [kV]	15.0
Run [°C]	60
Run Time [min]**	28

* El tiempo de inyección puede diferir del ajuste estándar entre 1-20 s según la muestra. Si se trata de muestras de referencia con picos muy altos, para evitar las superposiciones se puede seleccionar un tiempo de inyección más corto. Con bajas cantidades de ADNc o con material de pacientes críticos pueden ser necesarios hasta 20 s.

** En función de las condiciones de análisis se debería ajustar el Run Time para Mentepe® **AMLplex^{QS}** de modo que sea posible analizar fragmentos hasta longitudes de **550 bp**.

9.2 Electroforesis en el ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer

Las instrucciones generales sobre el analizador, sobre la calibración espectral y sobre el uso del programa ABI PRISM® 3100 Data Collection Software, versión 1.01 o 1.1, así como del software GeneScan® figuran en el correspondiente manual: *ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer User's Manual*. Consulte la información sobre los sistemas con el software Data Collection 2.0 o 3.0 en el capítulo 6.

El sistema de 4 capilares tiene la denominación ABI 3100-Avant y el sistema capilar de 16 la denominación ABI 3100.

Para combinar los cinco colorantes fluorescentes **6-FAM, BTG, BTY, BTR y BTO** está prevista la utilización del **set de filtros G5** virtual (en lo que sigue nos referiremos a la matriz estándar como **BT5**).

Tabla 16 Materiales necesarios para el uso del analizador ABI 3100 Genetic Analyzer

Material	Propiedad
Capilares*	36 cm Capillary Array for 3100-Avant/3100
Polímeros*	POP-4™ Polymer for 3100
Tampón	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

*Son posibles otros ajustes del aparato

9.2.1 Calibración espectral / Crear matriz

Antes de analizar la longitud de los fragmentos es necesario realizar una calibración espectral del sistema ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer. De ese modo se genera una matriz que corrige la superposición de los espectros de emisión de fluorescencias cromáticas específicas.

La calibración espectral se divide en las siguientes etapas:

- Preparación de la matriz estándar para la calibración espectral
- Carga del estándar en la placa de 96 pocillos (una muestra por capilar)
- Especificación de la composición de las placas
- Ejecución de la calibración espectral y comprobación de la matriz

Preparación de la matriz estándar para la calibración espectral

Prepare la mezcla de formamidas HiDi™ y la matriz estándar BT5 múltiple.

Tabla 17 Preparación de la matriz estándar BT5 múltiple para el ABI 3100 Genetic Analyzer

Componentes	Volumen para 4 capilares (ABI 3100-Avant)	Volumen para 16 capilares (ABI 3100)
Formamidas Hi-Di™	60,0 µL	204,0 µL
Matriz estándar BT5	5,0 µL	17,0 µL
Posición	A1-D1	A1-H1 y A2-H2

- Deposite 12 µl de la mezcla en la placa de 96 pocillos (ver la posición específica en la Tabla 17)
- Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos en un termociclador de PCR y deje enfriar las muestras a 4 °C en el aparato

- Coloque las muestras en el aparato para el análisis como se indica en las instrucciones de uso del fabricante del mismo

Realización de la calibración espectral

Para que la calibración con el software Data Collection 1.0.1 o 1.1 se ejecute correctamente es necesario modificar primero una única vez los **Parámetros** de la Spectral Calibration para **DyeSetG5**.

Spectral Parameter

- Modificación de los parámetros en la ruta:
D:\AppliedBio\Support Files\Data Collection Support Files\CalibrationData\Spectral Calibration\ParamFiles
- Seleccionar **MtxStd{Genescan_SetG5}** para abrir el archivo PAR
- Modificación del **Condition Bounds Range** a [1.0;20.0]
- Seleccionar **File Save As** para guardar el archivo de parámetros con un nombre nuevo, p. ej. MtxStd{Genescan_SetG5_BT5}.par

Utilice siempre el archivo de parámetros generado para la calibración espectral con la matriz estándar Biotype® **BT5**.

Editor de placas para la calibración espectral (I)

- Colocar la placa de 96 pocillos en el Autosampler
- Abrir el software ABI PRISM® 3100 Data Collection
- En **Plate View** del software 3100 Data Collection hacer clic en **New** para abrir el **Plate Editor Dialog**
- Introducir el nombre de la placa
- Seleccionar **Spectral Calibration**
- Seleccionar **96-Well** como tipo de placa y pulsar **Finish**

Editor de placas para la calibración espectral (II)

Tabla 18 Parámetros en el editor de placas para la calibración espectral

Parámetro	Ajuste
Sample Name	Asignar nombre a las muestras de la matriz
Dye Set	G5
Spectral Run Module	<i>Default</i> (p. ej. Spect36_POP4)
Spectral Parameters	MtxStd{GeneScan_SetG5_BT5}.par (parámetros ya creados)

- Pulsar la celda superior de la tabla para seleccionar la columna entera, agregar la información de las muestras de la matriz seleccionadas con **Edit** → **Fill Down** y confirmar con **OK**
- Enlazar la placa de 96 pocillos con el nombre de la placa creado y con el Autosampler e iniciar el proceso
- Tras finalizar el proceso, comprobar en **Spectral Calibration Result** si se han calibrado correctamente todos los capilares (marcado con **A**). Si están marcados con **X**, siga las instrucciones del manual: *ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual*
- Pulsar **OK** para confirmar el proceso

Comprobación de la matriz

- Seleccione **Tools** → **Display Spectral Calibration** → **Dye Set** → **G5** para controlar la calibración espectral de cada capilar
- Cada capilar debería tener un indicador de calidad (**Q Value**) mínimo de 0.95 y un valor de condición (**C Value**) entre 1 y 20. Los dos valores tienen que situarse dentro del rango previamente definido
- Estime si se dispone de una línea base estable. En cada capilar tienen que reconocerse cinco picos con alturas de 1.000-5.000 RFU (eje Y) (rango óptimo: 2.000-4.000 RFU)
- Por favor, compruebe la nueva matriz con sus muestras actuales. Con la nueva matriz no debería producirse **ninguna** superposición (Pull-up Peaks) entre los diferentes paneles de colores (B, G, Y, R, O)
- Si la calibración se ha ejecutado correctamente en todos los capilares, hay que activar manualmente el archivo de calibración actual para **Dye Set G5** en **Tools** → **Set Active Spectral Calibration**. Se puede cambiar el nombre en **Set Matrix Name** (p. ej. BT5_fecha de la calibración)
- Si la calibración no es correcta, intente reinyectar las muestras con un tiempo de inyección o una intensidad de corriente mayores. Para ello es necesario modificar Spectral Run Modul. Se puede reinyectar las muestras hasta tres veces. También se puede utilizar más matriz estándar para la calibración.

9.2.2 Preparación de las muestras

Tabla 19 Solución de muestra para la preparación en la electroforesis capilar en gel

Componentes	Volumen por reacción
Formamidas Hi-Di™	12,0 µL
ADN estándar 550 (BTO)	0,5 µL

- Prepare 12 µL de la mezcla de Tabla 19 para todas las muestras

- Añada a la mezcla 1 μL del producto de PCR (diluido si es preciso) o de la escalera alélica en cada pocillo
- Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos en un termociclador de PCR y deje enfriar las muestras a 4 °C en el aparato
- Coloque las muestras en el aparato para el análisis como se indica en las instrucciones de uso del fabricante del mismo

Puesto que la inyección tiene lugar simultáneamente en todos los capilares, es necesario pipetear siempre 4 o 16 muestras en la placa del sistema multicapilar. Si hay que medir menos muestras, las posiciones sin muestra tienen que estar rellenas con 12 μL de formamida Hi-Di™.

Para garantizar la asignación de los alelos en el sistema multicapilar se deberían aplicar varias escaleras alélicas independientemente de la cantidad de muestras.

La temperatura ambiente puede influir en gran medida en el comportamiento de los productos de PCR en los sistema multicapilares y provocar picos dobles (split peaks) si la temperatura es demasiado baja. En determinadas circunstancias la temperatura afecta también a la velocidad de desarrollo de los fragmentos. Tenga en cuenta, por favor, que es necesario respetar la temperatura de trabajo recomendada por el fabricante del aparato. Las condiciones óptimas son >22 °C de temperatura ambiente.

Posibilidades para aumentar la intensidad de las señales

- Reducir el porcentaje del estándar de longitud de ADN 550 (BTO) a picos de aproximadamente 500 unidades de fluorescencia relativa (RFU)
- Purificar los productos de PCR antes del análisis

9.2.3 Configuración del software Data Collection

Antes del primer uso es necesario editar una única vez el Run Modul en **Dye Set G5**:

- Hacer clic en **Module Editor** para abrir la ventana de diálogo
- Seleccionar en la tabla **GeneScan** el **Run Module** correspondiente como modelo
- Modifique la tensión (**Injection Voltage**) a 3 kV y el tiempo de inyección (**Injection Time**) a 10 s

Run Module 3kV_10s_550bp

Tabla 20 Configuración de Run Modul para analizar muestras

Parámetro	Ajuste
Run Temperature [°C]	<i>Default</i>
Cap Fill Volume	<i>Default</i>
Maximum Current [A]	<i>Default</i>
Current Tolerance [A]	<i>Default</i>
Run Current [A]	<i>Default</i>
Voltage Tolerance [kV]	<i>Default</i>
Pre Run Voltage [kV]	<i>Default</i>
Pre Run Time [s]	<i>Default</i>
Injection Voltage [kV]	3.0
Injection Time [s]*	10
Run Voltage [kV]	<i>Default</i>
Number of Steps	<i>Default</i>
Voltage Step Interval	<i>Default</i>
Data Delay Time [s]	<i>Default</i>
Run Time [min]**	26

* El tiempo de inyección puede diferir del ajuste estándar entre 1-20 s según la muestra. Si se trata de muestras de referencia con picos muy altos, para evitar las superposiciones se puede seleccionar un tiempo de inyección más corto. Con bajas cantidades de ADNc o con material de pacientes críticos pueden ser necesarios hasta 20 s.

** En función de las condiciones de análisis se debería ajustar el Run Time para el Mentype® **AMLplex^{OS}** de modo que sea posible analizar fragmentos hasta longitudes de **550 bp**.

- Pulsar **Save As**, introducir el nombre del nuevo módulo (p. ej. 3kV_10s_550bp) y confirmar con **OK**
- Pulse **Close** para salir del **Run Module Editors**

Run starten

- Colocar la placa de 96 pocillos en el Autosampler
- Abrir el software ABI PRISM® 3100 Data Collection
- Entre en **Plate View** del software 3100 Data Collection y pulse **New** para abrir la ventana del **Plate Editor**
- Seleccionar **GeneScan**
- Seleccionar **96-Well** como tipo de placa y pulsar **Finish en Plate Editor**

Tabla 21 Parámetros del editor de placas para el análisis de datos

Parámetro	Ajustes
Sample Name	Asignar nombre a las muestras
Dyes	0
Color Info	Ladder o sample
Project Name	p. ej. 3100_Project1
Dye Set	G5
Run Module*	3kV_10s_550bp
Analysis Module 1	DefaultAnalysis.gsp

* Ver parámetros arriba

- Completar la tabla en el **Plate Editor** y pulsar **OK**
- Pulsar la celda superior de la tabla para seleccionar la columna entera y seleccionar **Edit** → **Fill Down** para asignar la información a la muestra seleccionada
- Enlazar la placa de 96 pocillos con el nombre de la placa creado y con el Autosampler e iniciar el proceso
- Tras el proceso los datos están disponibles como **Color Data** en la **Array View** del software 3100 Data Collection o bien como **Analyzed Sample Files** en la ruta D:/AppliedBio/3100/DataExtractor/ExtractRuns

9.3 Electroforesis en ABI PRISM®3130/3130xl Genetic Analyzer

Las instrucciones generales sobre el analizador, sobre la calibración espectral y sobre el uso del programa ABI PRISM® Data Collection versión 3.0 y el programa GeneMapper™ ID/ID-X figuran en el manual: *ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzers Getting Started Guide*.

El sistema de 4 capilares tiene la denominación ABI 3130 y el sistema de 16 capilares la denominación ABI 3130xl.

Para combinar los cinco colorantes fluorescentes **6-FAM, BTG, BTY, BTR** y **BTO** está prevista la utilización del **set de filtros Any5Dye** virtual (en lo que sigue nos referiremos a la matriz estándar como **BT5**).

Tabla 22 Materiales necesarios para el uso del analizador ABI 3130 Genetic Analyzer

Material	Propiedades
Capilares*	36 cm Capillary Array for 3130/3130xl
Polímeros*	POP-4™ Polymer for 3130
Tampón	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

*Son posibles otros ajustes del aparato

9.3.1 Calibración espectral / Crear matriz

Antes de analizar la longitud de los fragmentos es necesario realizar una calibración espectral con fragmentos de PCR de los cinco colorantes fluorescentes respectivos

6-FAM, BTG, BTY, BTR y BTO para el analizador utilizado. De ese modo se genera una matriz que corrige la superposición de los espectros de emisión de fluorescencias cromáticas específicas.

La calibración espectral se divide en las siguientes etapas:

- Preparación de la matriz estándar para la calibración espectral
- Carga del estándar en la placa de 96 pocillos (una muestra por capilar)
- Elaboración del Instrument Protocol para la calibración espectral (Protocol Manager)
- Definir la composición de las placas en el editor de placas (Plate Manager)
- Ejecución de la calibración espectral y comprobación de la matriz

Preparación de la matriz estándar para la calibración espectral

Tabla 23 Solución de la matriz estándar BT5 múltiple para el sistema ABI 3130 Genetic Analyzer

Componentes	Volumen para 4 capilares	Volumen para 16 capilares
	(ABI 3130)	(ABI 3130xl)
Formamidas Hi-Di™	60,0 µL	204,0 µL
Matriz estándar BT5	5,0 µL	17,0 µL
Posición	A1-D1	A1-H1 y A2-H2

- Deposite 12 µl de la mezcla en la placa de 96 pocillos (ver la posición específica en la Tabla 23)
- Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos en un termociclador de PCR y deje enfriar las muestras a 4 °C en el aparato
- Coloque las muestras en el aparato para el análisis como se indica en las instrucciones de uso del fabricante del mismo

Realización de la calibración espectral

- Coloque la placa de 96 pocillos en el Autosampler
- Entre en el **Protocol Manager** del programa Data Collection, ventana **Instrument Protocol**, y pulsar **New** para abrir el **Protocol Editor**

Instrument-Protocol para la calibración espectral

Tabla 24 Ajustes para la calibración espectral en el ABI 3130 Genetic Analyzer

Protocol Editor	Ajustes
Nombre	<i>User</i> (z. B. Spectral36_POP4_BT5)
Tipo	SPECTRAL
Dye Set	Any5Dye
Polímeros*	<i>User</i> (z. B. POP4)
Array Length*	<i>User</i> (p. ej. 36 cm)
Chemistry	Matriz estándar
Run Module*	<i>Default</i> (p. ej. Spect36_POP4_1)

* En función del tipo de polímero utilizado y de la longitud del capilar

- Seleccionar **OK** para salir del **Protocol Editor**
- Pulsar **New** en **Plate Manager** del programa Data Collection para abrir **New Plate Dialog**

Editor de placas para la calibración espectral (I)

Tabla 25 Ajustes en el editor de placas para la calibración espectral

New Plate Dialog	Ajustes
Nombre	p. ej. Spectral_BT5_date
Application	Spectral Calibration
Plate Type	96-Well
Owner Name / Operator Name	...

- Seleccionar **OK**. De ese modo se abre automáticamente una nueva tabla en el editor de placas

Editor de placas para la calibración espectral (II)

Tabla 26 Asignación de nombres a las muestras para la calibración espectral

Parámetro	Ajustes
Sample Name	Asignar nombre a las muestras de la matriz
Priority	p. ej. 100
Instrument Protocol 1	Spectral36_POP4_BT5 (ajuste descrito antes)

- Pulsar la celda superior de la tabla para seleccionar la columna entera, agregar la información de las muestras de la matriz seleccionadas con **Edit** → **Fill Down** y confirmar con **OK**
- Pulsar en **In Run Schedule** → **Find All** y seleccionar luego **Link** para enlazar la placa de 96 pocillos, con la denominación de placas recién creada, con el Autosampler (posición A o B). Y, a continuación, iniciar el proceso

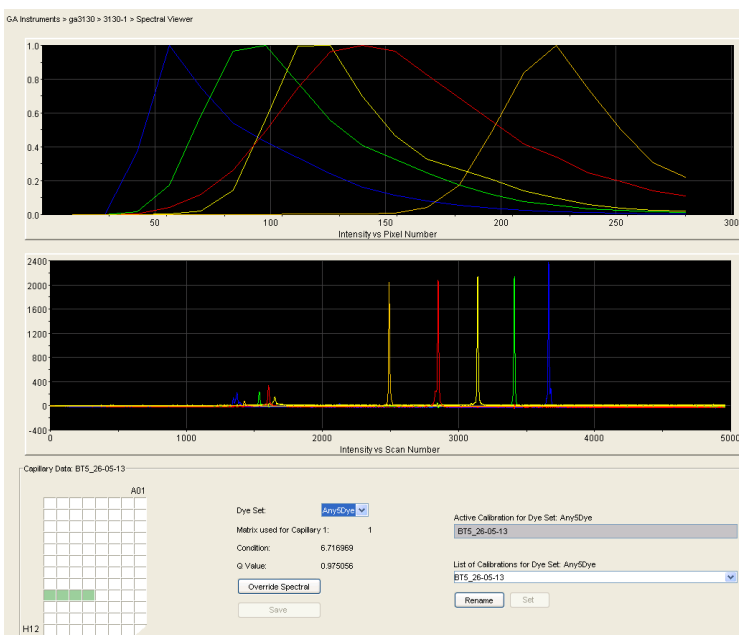


Figura 4 Electroforegrama de la calibración espectral en el analizador ABI 3130 Genetic Analyzer con la matriz estándar BT5 múltiple

Comprobación de la matriz

- Cada capilar debería tener un indicador de calidad (**Q Value**) mínimo de 0.95 y un valor de condición (**C Value**) entre 1 y 20 (Figura 4).
- Estime si se dispone de una línea base estable. En cada capilar tienen que reconocerse cinco picos con alturas de 1.000-5.000 RFU (eje Y) (rango óptimo: 2.000-4.000 RFU), ver figura.
- Por favor, compruebe la nueva matriz con sus muestras actuales. Con la nueva matriz no debería producirse **ninguna** superposición (Pull-up Peaks) entre los diferentes paneles de colores (B, G, Y, R, O).
- Si la calibración se ha ejecutado correctamente en todos los capilares, se aplica automáticamente el archivo de calibración para **Any5Dyes** en el **Spectral Viewer**. El nombre puede ser modificado con la opción **Rename** (p. ej. BT5_fecha de la calibración).
- Si la calibración no es correcta, repita la inyección incrementando el tiempo o la tensión de la inyección. Para ello hay que modificar el Run Module de la calibración espectral. Las pruebas pueden ser reinyectadas hasta tres veces. También se puede utilizar más matriz estándar para una nueva calibración espectral.

9.3.2 Preparación de las muestras

Tabla 27 Solución de mezcla desnaturalizada para preparar la electroforesis capilar en gel

Componente	Volumen por reacción
Formamidas Hi-Di™	12,0 µL
ADN estándar 550 (BTO)	0,5 µL

- Prepare 12 µL de la mezcla de Tabla 27 para todas las muestras
- Añada a la mezcla 1 µL del producto de PCR (diluido si es preciso) o de la escalera alélica en cada pocillo
- Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos en un termociclador de PCR y deje enfriar las muestras a 4 °C en el aparato
- Coloque las muestras en el aparato para el análisis como se indica en las instrucciones de uso del fabricante del mismo

Puesto que la inyección tiene lugar simultáneamente en todos los capilares, es necesario pipetear siempre 4 o 16 muestras en la placa del sistema multicapilar. Si hay que medir menos muestras, las posiciones sin muestra tienen que estar rellenas con 12 µL de formamida Hi-Di™.

Para garantizar la asignación de los alelos en el sistema multicapilar se debería aplicar varias escaleras alélicas independientemente de la cantidad de muestras.

La temperatura ambiente puede influir en gran medida en el comportamiento de los productos de PCR en los sistema multicapilares y provocar picos dobles (split peaks) si la temperatura es demasiado baja. En determinadas circunstancias la temperatura afecta

también a la velocidad de desarrollo de los fragmentos. Tenga en cuenta, por favor, que es necesario respetar la temperatura de trabajo recomendada por el fabricante del aparato. Las condiciones óptimas son >22 °C de temperatura ambiente.

Posibilidades para aumentar la intensidad de las señales

- Reducir los porcentajes del estándar de longitud de ADN 550 (BTO) a picos de aproximadamente 500 unidades de fluorescencia relativa (RFU)
- Purificar los productos de PCR antes del análisis

9.3.3 Configuración del software Data Collection

Antes del primer análisis con las muestras hay que editar el Run Modul como se indica a continuación:

- Pulsar **New** en el **Module Manager** del programa Data Collection para abrir el **Run Module Editor**.

Run Module 3kV_10s_550bp

Tabla 28 Ajustes de Run Modul en el sistema ABI 3130 Genetic Analyzer

Parámetro	Ajustes
Oven Temperature [°C]	<i>Default</i>
Poly Fill Volume	<i>Default</i>
Current Stability [µA]	<i>Default</i>
PreRun Voltage [kV]	<i>Default</i>
PreRun Time [s]	<i>Default</i>
Injection Voltage [kV]	3.0
Injection Time [s]*	10
Voltage Number of Steps	<i>Default</i>
Voltage Step Interval	<i>Default</i>
Data Delay Time [s]	<i>Default</i>
Run Voltage [kV]	<i>Default</i>
Run Time [s]**	1560

* El tiempo de inyección puede diferir del ajuste estándar entre 1 y 20 s según la muestra. Si se trata de muestras de referencia con picos muy altos, para evitar las superposiciones se puede seleccionar un tiempo de inyección más corto. Con bajas cantidades de ADNc o con material de pacientes críticos pueden ser necesarios hasta 20 s.

** En función de las condiciones de análisis se debería ajustar el Run Time para el Mentype® **AMPLplex^{QS} de modo que** sea posible analizar fragmentos hasta longitudes de **550 bp**.

- Pulsar **Save As**, introducir el nombre del nuevo módulo (p. ej. 3kV_10s_550bp) y confirmar con **OK**
- Pulsar **Close** para salir del **Run Module Editor**

Run starten

- Coloque la placa de 96 pocillos en el Autosampler
- Entrar en **Protocol Manager** del programa Data Collection, ventana **Instrument Protocol**, y pulsar **New** para abrir el **Protocol Editor**

Instrument-Protocol

Tabla 29 Parámetros del Instrument Protocol en el ABI 3130 Genetic Analyzer para el análisis de muestras

Protocol Editor	Ajustes
Nombre	p. ej. Run36_POP4_BT5_26min
Tipo	REGULAR
Run Module*	3kV_10s_550bp
Dye Set	Any5Dye

* Ver parámetros arriba

- Seleccionar **OK** para salir del editor de protocolo

Antes del primer análisis de muestras hay que crear la placa a medir como se indica a continuación:

- Entrar en **Plate Manager** del programa Data Collection y pulsar **New** para abrir **New Plate Dialog**

Editor de placas (I)

Tabla 30 Ajustes en el editor de placas

New Plate Dialog	Ajustes
Nombre	p. ej. Plate_BT5_Date
Application	Seleccione GeneMapper Application
Plate Type	96-Well
Owner Name / Operator Name	...

- Seleccionar **OK**. De ese modo se abre automáticamente una nueva tabla en el editor de placas

Editor de placas (II)

Tabla 31 Asignación de nombres a las muestras en el editor de placas

Parámetro	Ajustes
Sample Name	Asignar nombre a las muestras
Priority	p. ej. 100 (Default)
Sample Type	Sample or allelic ladder
Size Standard	p. ej. SST-BTO_60-550bp
Panel	p. ej. AMLplex_Panels_v2
Analysis Method	p. ej. AMLplex_HID_3130_200rfu
Snp Set	-
User-defined 1-3	-
Results Group 1	(seleccionar Results Group)
Instrument Protocol 1	Run36_POP4_BT5_26min (ajuste descrito antes)

- Pulsar las celdas superiores de la tabla para seleccionar la columna entera, agregar la información de las muestras seleccionadas con **Edit** → **Fill Down** y confirmar con **OK**.
- Pulsar en **In Run Schedule** → **Find All** y seleccionar luego **Link** para enlazar la placa de 96 pocillos, con la denominación de placas recién creada, con el Autosampler (posición A o B). Y, a continuación, iniciar el proceso.
- En **Capillaries Viewer** o **Cap/Array Viewer** se puede observar la calidad de los datos brutos para cada capilar durante el proceso. Los posibles mensajes de error (**Error Status**) se muestran en **Event Log**.
- Los datos del proceso con las muestras están representados en una tabla en **Run History** o en **Cap/Array Viewer** del programa Data Collection. Los datos del análisis de las muestras se guardan en la carpeta **Run Folder** del **Results Group** seleccionado previamente.

9.4 Electroforesis con ABI PRISM®3500/3500xL Genetic Analyzer

Las instrucciones generales sobre el analizador, sobre la calibración espectral y sobre el uso del programa Applied Biosystems 3500 Series Data Collection, versión 3.0 y el programa GeneMapper® ID-X versión 1.4, figuran en el manual correspondiente: *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide*.

El sistema de 8 capilares tiene la denominación ABI 3500 y el sistema de 24 capilares la denominación ABI 3500xL.

Para el uso combinado de los cinco colorantes fluorescentes **6-FAM, BTG, BTY, BTR y BTO** está prevista la utilización del **set de filtros AnyDye** virtual (en lo que sigue nos referiremos a la matriz estándar como **BT5**).

Tabla 32 Consumibles necesarios en el ABI 3500 Genetic Analyzer

Material	Propiedad
Capilares*	36 cm Capillary Array for 3500/3500xL
Polímeros*	POP-4™ Polymer for 3500/3500xL
Tampón	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA for 3500/3500xL

*Son posibles otros ajustes del aparato

9.4.1 Calibración espectral / Crear matriz

Antes de analizar la longitud de los fragmentos es necesario realizar una calibración espectral con fragmentos de PCR de los cinco colorantes fluorescentes respectivos

6-FAM, BTG, BTY, BTR y BTO para el analizador utilizado.

De ese modo se genera una matriz que corrige la superposición de los espectros de emisión de fluorescencias cromáticas específicas.

La calibración espectral se divide en las siguientes etapas:

- Preparación de la matriz estándar para la calibración espectral
- Carga del estándar en la placa de 96 pocillos (una muestra por capilar)
- Preparación del instrumento para la creación del Dye Set BT5
- Ejecución de la calibración espectral y comprobación de la matriz

Preparación de la matriz estándar para la calibración espectral

Tabla 33 Matriz estándar BT5 múltiple para la calibración espectral en el sistema ABI 3500 Genetic Analyzer

Componente	Volumen para 4 capilares ABI 3500	Volumen para 24 capilares ABI 3500xl
Formamidas Hi-DI™	108,0 µL	300,0 µL
Matriz estándar BT5	9,0 µL	25,0 µL
Position A1-H1	A1-H1	A1-H1, A2-H2, A3-H3*

* Cuando se utilice una placa de 384 pocillos se debería depositar 10 µl de la mezcla en las posiciones 1, 3, y 5 de las filas A, C, E, G, I, K, M, y O.

- Deposite 12 µl de la mezcla en la placa de 96 pocillos (ver la posición específica en la Tabla 33)
- Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos en un termociclador de PCR y deje enfriar las muestras a 4 °C en el aparato
- Coloque las muestras en el aparato para el análisis como se indica en las instrucciones de uso del fabricante del mismo

Preparación del instrumento

Por favor, verifique que se haya ejecutado una **Spatial Calibration** antes de la calibración espectral. Esta calibración solo es necesaria después de montar un nuevo Capillary Arrays. El proceso está explicado en detalle en la *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* User Guide.

Preparación del Dye Set BT5

Antes de la calibración espectral es necesario configurar el Dye Set para la matriz estándar BT5.

1. En **Library**, seleccione **Analyze** y **Dye Sets** y pulse luego **Create**.
2. Asigne un nombre al Dye Set en **Dye Set Name** p. ej. BT5.
3. Seleccione **Matrix Standard** como **Chemistry** y **AnyDye Template** como Dye Set Template.
4. Desactive **Purple** en el campo **Arrange Dyes**. Asegúrese de que estén activados todos los demás colores.
5. En **Calibration Peak Order** hay que asignar los colores como se sigue: **5 – blue, 4 – green, 3 – yellow, 2 – red, and 1 – orange**.
6. En el campo **Parameters** no es necesario realizar ningún cambio.

7. Pulse **Save** para confirmar los cambios.

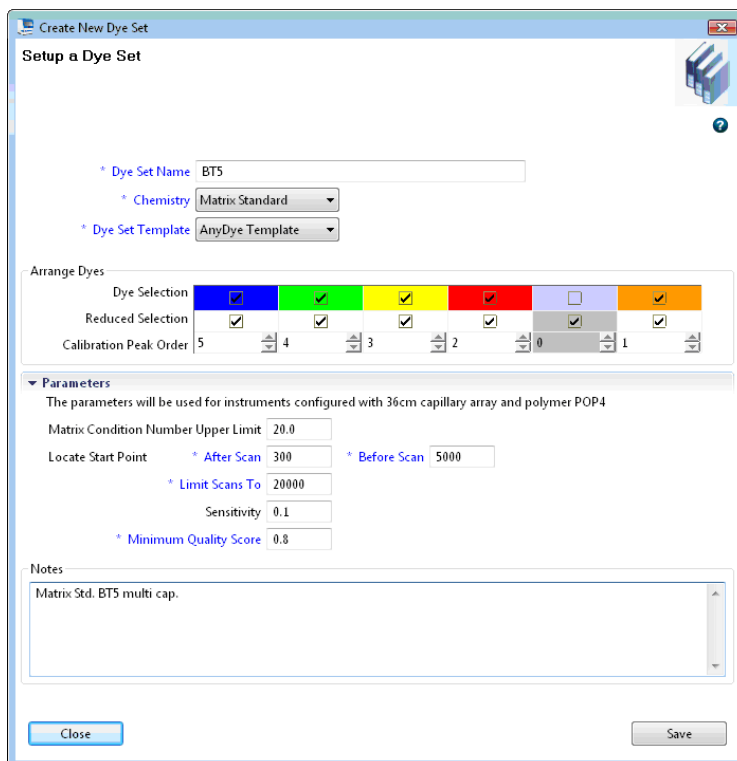


Figura 5 Ajustes para la calibración espectral del Dye Set BT5

Realización de la calibración espectral

Coloque la placa multipocillos cargada con la mezcla en el Autosampler para la calibración espectral e inicie la calibración.

1. Seleccione **Maintenance** en el panel del programa 3500 Series Data Collection para abrir la pantalla Spectral Calibration Screen.
2. Es necesario definir la cantidad de cavidades de la placa multipocillos y sus posiciones en el sistema.
3. Seleccione **Matrix Standard** como Chemistry Standard y **BT5** para Dye Set (creado antes).

4. Active **Allow Borrowing** (opcional).

5. Pulse **Start Run**.

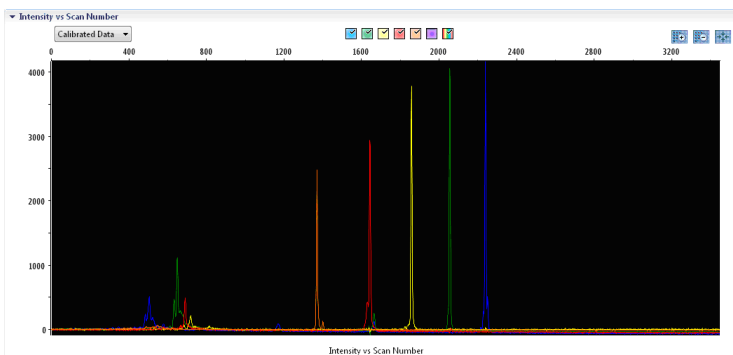


Figura 6 Electroforegrama de la calibración espectral con la matriz estándar BT5 múltiple en el sistema ABI 3500 Genetic Analyzer

Comprobación de la matriz

- Cada capilar debería tener un indicador de calidad (**Q Value**) mínimo de 0.8 y un valor de condición (**C Value**) entre 1 y 20.
- Estime si se dispone de una línea base estable. En cada capilar tienen que reconocerse cinco picos con alturas de 1.000-5.000 RFU (eje Y) (rango óptimo: 2.000-4.000 RFU), ver Figura 6.
- La calibración correcta se muestra mediante el color verde en **Overall** para cada capilar.
- Si están correctamente calibrados todos los capilares, pulse **Accept Results**.
- Si la calibración no es correcta, pulse **Reject Results**. En ese caso nos remitimos al capítulo “spectral calibration troubleshooting” de la guía *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guides*.

9.4.2 Preparación de las muestras

Tabla 34 Solución desnaturalizada por reacción en la preparación para la electroforesis capilar en gel

Componente	Volumen por reacción
Formamidas Hi-Di™	12,0 µL
ADN estándar 550 (BTO)	0,5 µL

- Prepare 12 µL de la mezcla de Tabla 34 para todas las muestras
- Añada a la mezcla 1 µL del producto de PCR (diluido si es preciso) o de la escalera alélica en cada pocillo
- Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos en un termociclador de PCR y deje enfriar las muestras a 4 °C en el aparato
- Coloque las muestras en el aparato para el análisis como se indica en las instrucciones de uso del fabricante del mismo

Puesto que la inyección tiene lugar simultáneamente en todos los capilares, es necesario pipetear siempre 8 o 24 muestras en la placa del sistema multicapilar. Si hay que medir menos muestras, las posiciones respectivas tienen que estar rellenas con 12 µL de formamida Hi-Di™.

Para garantizar la asignación de los alelos en el sistema multicapilar se debería aplicar varias escaleras alélicas independientemente de la cantidad de muestras.

La temperatura ambiente puede influir en gran medida en el comportamiento de los productos de PCR en los sistema multicapilares y provocar picos dobles (split peaks) si la temperatura es demasiado baja.

En determinadas circunstancias la temperatura afecta también a la velocidad de desarrollo de los fragmentos. Tenga en cuenta, por favor, que es necesario respetar la temperatura de trabajo recomendada por el fabricante del aparato. Las condiciones óptimas son >22 °C de temperatura ambiente.

Possibilidades para aumentar la intensidad de las señales

- Reducir los porcentajes del estándar de longitud de ADN 550 (BTO) a picos de aproximadamente 500 unidades de fluorescencia relativa (RFU)
- Purificar los productos de PCR antes del análisis

9.4.3 Ajustes para el análisis

Para el primer análisis con la aplicación Mentype® **AMLplex^{QS}** es necesario crear protocolos específicos dentro del programa 3500 Series Data Collection.

Creación del Instrument Protocol

- En **Library**, seleccione **Analyze / Instrument protocol** y pulse **Create**
- Modifique los parámetros como se indica en la tabla más abajo:

Instrument Protocol para Mentype® AMLplex^{DS}

Tabla 35 Configuración del Instrument Protocol en el ABI 3500 Genetic Analyzer

Parámetro	Ajuste
Application Type	HID or Fragment
Capillary Length	<i>Default</i>
Polímero	<i>Default</i>
Dye Set	BT5
Run Module	<i>Default</i>
Protocol Name	p. ej. Mentype AMLplex ^{DS}
Oven Temperature [°C]	<i>Default</i>
Run Voltage [kV]	<i>Default</i>
Injection Voltage [kV]	3.0
Run Time [s]**	1560**
PreRun Time [s]	<i>Default</i>
Injection Time [s]*	8*
Data Delay Time [s]	<i>Default</i>
Advanced Options	<i>Default</i>

* El tiempo de inyección puede diferir del ajuste estándar entre 1-20 s según la muestra. Si se trata de muestras de referencia con picos muy altos, para evitar las superposiciones se puede seleccionar un tiempo de inyección más corto. Con bajas cantidades de ADNc o con material de pacientes críticos pueden ser necesarios hasta 20 s.

** En función de las condiciones de análisis se debería ajustar el Run Time para el Mentype® AMLplex^{DS} de modo que sea posible analizar fragmentos hasta longitudes de **550 bp**.

- Pulse **Save** para confirmar los ajustes.

Ajustes para el estándar de longitud

- En **Library**, seleccione **Analyze / Size Standards** y pulse **Create**
- Modifique los parámetros como se indica en la Tabla 34 más abajo:

Tabla 36 Ajustes de los estándares de tamaño en el ABI 3500 Genetic Analyzer

Parámetro	Ajuste
Size Standard	BTO_550
Dye Color	Orange

El DNA Size Standard 550 (BTO) tiene que ser utilizado con las siguientes longitudes de fragmentos: **60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525, and 550** bp.

- Pulse **Save** para confirmar los ajustes.

Configuración de QC o de Size Calling Protocol

- En **Library** seleccione **Analyze / QC o Size Calling Protocol** y pulse **Create**
- Modifique los parámetros como se indica en la tabla más abajo:

Tabla 37 Ajustes de QC o de Size Calling Protokoll en el ABI 3500 Genetic Analyzer

Parámetro	Ajuste
Protocol Name	Nombre
Size Standard	BTO_550 (ya configurado)
Sizecaller	Size Caller v.1.1.0

- Seleccione **disable Purple** en **Analysis Settings / Peak Amplitude Threshold**. Todos los demás colores tienen que estar activados.
- Todos los demás ajustes permanecen en **Default**.
- Pulse **Save** para confirmar los ajustes.

Crear un ensayo

- En **Library**, seleccione **Manage / Assays** y pulse **Create**
- Modifique los parámetros como se indica en la tabla más abajo:

Tabla 38 Parámetros de ensayo en el ABI 3500 Genetic Analyzer

Parámetro	Ajuste
Assay Name	p. ej. Mentype AMLplex ^{QS}
Color	Default
Application Type	HID o fragmento
Instrument Protocol	p. ej. Mentype AMLplex ^{QS}
QC (Size Calling) Protocol	p. ej. BTO_550

- Pulse **Save** para confirmar los ajustes.

Inicio del análisis

- Colocar la placa multipocillos en Autosampler
- Pulsar en el panel del programa Data Collection la opción **Create New Plate**
- En **Define Plate Properties**, seleccionar **Plate Details**
- Modifique los parámetros como se indica en la Tabla 39 más abajo:

Platten Details

Tabla 39 Detalles de las placas en el ABI 3500 Genetic Analyzer

Parámetro	Ajuste
Nombre	p. ej. Mentype AMLplex ^{QS}
Number of Wells	96 or 384
Plate Type*	HID o fragmento
Capillary Length	36 cm
Polímero	POP4

- Pulse **Assign Plate Contents** para confirmar los ajustes
- Defina la posición de cada cavidad ocupada con una muestra de paciente o escalera alélica para Data Collection y la evaluación
- Asigne a cada cavidad conocida un **Assay** (indispensable), un **File Name Conventions** y un **Result Group**
- Pulse **Link the plate for Run** e introduzca el nombre del análisis
- Pulse **Start Run**

10. Evaluación de datos

10.1 Programa y modelos de evaluación

La evaluación de datos se efectúa con el programa GeneMapper™ ID o GeneMapper™ ID-X (Applied Biosystems™).

Para facilitar la evaluación de los datos, Biotype GmbH pone a disposición parámetros ya ajustados en www.biotype.de (Tabla 40). Estos pueden ser importados en la versión correspondiente del GeneMapper™, permitiendo prescindir de la configuración manual de los parámetros de análisis.

Aviso: La importación y la asignación de los alelos con ayuda de las plantillas de evaluación disponibles solo está garantizada para el programa GeneMapper™ ID/ID-X. Si utiliza GeneMapper™ pueden producirse problemas al importar algunas plantillas de evaluación.

Aviso: las plantillas disponibles para los parámetros de Bins y Panel definen la longitud de los distintos fragmentos. Por las ligeras diferencias de capacidad de los distintos equipos de electroforesis capilar en gel pueden producirse mínimas variaciones entre los equipos. Biotype GmbH puede efectuar un ajuste específico de Bins y de Panel. Por favor, póngase en contacto con nosotros support@biotype.de.

Tabla 40 Plantillas disponibles para la importación en GeneMapper™ ID/ID-X

Plantilla	Nombre	
Panels	AMLplex_Panels_v2/v2x	O versión superior
BinSets	AMLplex_Bins_v2/v2x	O versión superior
Size Standard	SST-BTO_60-550bp	
Analysis Method	AMLplex_HID_310_200RFU	Recomendado
	AMLplex_HID_3130_200RFU	Recomendado
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Setting	Table for 10 Alleles	
	Table for 22 Alleles	

A continuación se exponen los parámetros necesarios para la configuración manual del método de análisis (Tabla 41).

Tabla 41 Parámetros para la configuración manual de un método de análisis en GeneMapper™ ID/ID-X

Parámetro	Ajuste
Peak Detection Algorhythm	Advanced
Allele	No specific stutter ratio, set all to 0.0
	Amelogenin cut off: 0.0
Ranges	Analysis: Full Range
	Sizing: All Sizes
Smoothing and Baselineing	Smoothing: Light
	Baseline Window: 51 pts
Size Calling Method	Local Southern Method
Peak Detection	Peak Amplitude Thresholds
	B: 200; Y: 200; G: 200; R: 200; O: 50
	Min. Peak Half Width: 2 pts
	Polynomial Degree: 3
	Peak Window Size: 15 pts*
Peak Quality	Slope Thresholds: 0.0
	Heterozygote Balance: 0.0
	Max expected alleles: 22

* Si es necesario se puede reducir el Peak Window Size a 11 pts.

10.2 Procedimiento de evaluación de datos

10.2.1 Requisitos generales mínimos para la evaluación de datos

Los archivos fsa de la electroforesis capilar en gel son evaluados cualitativamente, es decir que se verifica la presencia de picos de amplificación. Un pico tiene que alcanzar un mínimo de 200 RFU y tener un tamaño al menos 3 veces el ruido de fondo de la línea base. Estos criterios se aplican a los picos de control (controles QS y ABL), así como a los picos de las fusiones genéticas.

La única excepción es el estándar de tamaño Size Standard 550 (BTO), que solo tiene que alcanzar una altura pico mínima de 50 RFU.

10.2.2 Control del estándar de tamaño Size Standard 550 (BTO)

La determinación de las longitudes exactas de los fragmentos de los productos amplificados depende del estándar de longitud de ADN utilizado. Debido a la complejidad de algunos Loci se debería tomar el mayor número posible de puntos de referencia distribuidos homogéneamente para determinar las longitudes. Utilice para ello el estándar de longitud de ADN Size Standard 550 (BTO, Figura 7) con las longitudes de 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 y 550 bp.

Compruebe en el electroferograma (canal naranja) de todas las muestras si están presentes todos los alelos del estándar de tamaño, si poseen una altura pico suficiente de al menos 50 RFU y si están correctamente asignados (ver Figura 7).

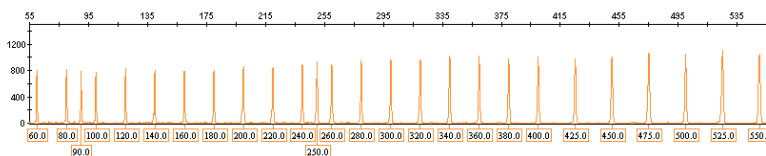


Figura 7 Electroferograma del Size Standard 550 (BTO), analizado en ABI 3500, con el programa GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, eje y: 55-560 bp, eje x: 0-1500 RFU

Aviso: si no se han analizado todos los fragmentos del estándar de tamaño en las diferentes muestras, la valoración de la escalera alélica y de las muestras puede ser insuficiente. Verifique siempre si se ha ejecutado correctamente el análisis del estándar de tamaño.

10.2.3 Comprobación de la escalera alélica /Allelic Ladder

La escalera alélica contiene todos los fragmentos detectables con el Mentype® **AMLplex^{QS}** (ver Tabla 1 y Figura 8). Por consiguiente, esos fragmentos tienen que estar presentes en la escalera alélica y ser detectados con al menos una altura de 200 RFU. Los genes de fusión y las variantes de transcripción asociadas se encuentran siempre en un canal de color (Tabla 42).

Tabla 42 Distribución de las fusiones genéticas en los canales de color

Canal azul	Canal verde	Canal amarillo
CBFB-MYH11	DEK-NUP214 (DEK-CAN)	PML-RARA
BCR-ABL	KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6)	
PICALM-MLLT10 (CALM-AF10)	KMT2A-MLLT3 (MLL-AF9)	
RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)	KMT2A-ELL (MLL-ELL)	
NPM1-MLF1	KMT2A-PTD (MLL-PTD)	
Controles QS y ABL		

Aviso: si utilizando los modelos de evaluación (sobre todo de Bins y Panels) no se señalan automáticamente todos los fragmentos de la escalera alélica dirijase a support@biotype.de, pues puede ser necesaria una adaptación de las plantillas a su configuración. En ese caso podría producirse una calificación errónea de los picos en las muestras.

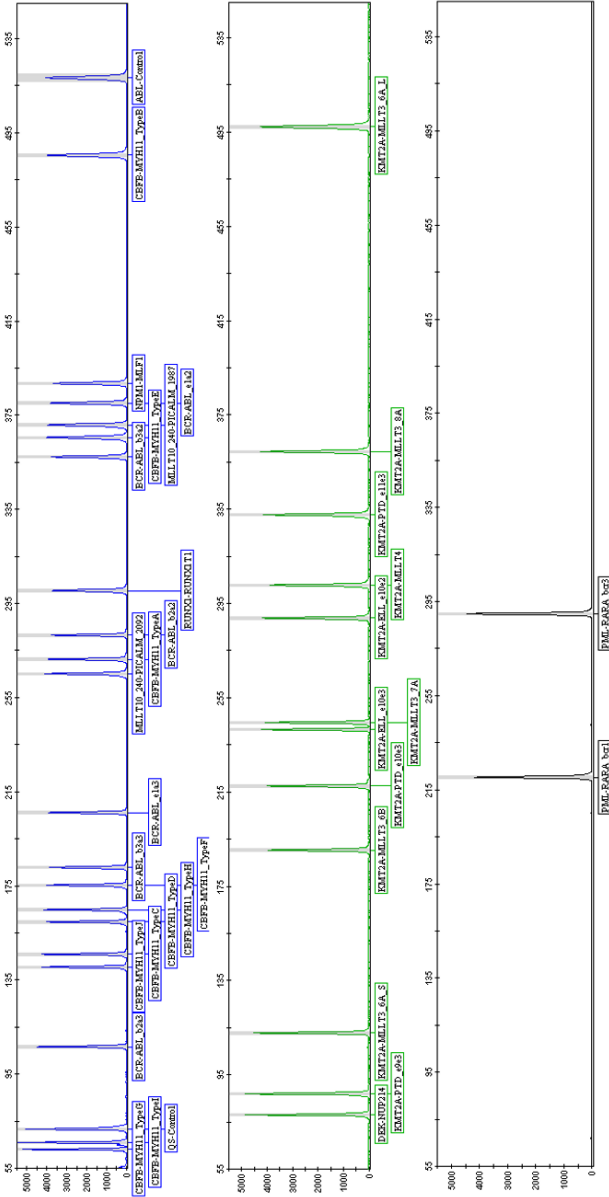


Figura 8 Electroforegrama de la escalera alélica, analizada en ABI 3500, evaluación con el programa GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, eje y: 55-550 bp, eje x: 0-5500 RFU

10.2.4 Comprobación del Control cDNA KAS-1

El kit Mentype® **AMLplex^{QS}** incluye el control positivo Control cDNA KAS-1*, que es positivo para la fusión genética RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO).

Compruebe si los picos de control de QS y ABL tienen una altura suficiente. Compruebe si el pico para la translocación RUNX1-RUNX1T1 tiene una altura suficiente en el electroforegrama (Figura 9). Compruebe que no se presente ningún producto secundario inesperado en el electroforegrama.

* El cultivo celular para la obtención de ADNc ha sido adquirido de: DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. El uso de ese ADNc está previsto exclusivamente para el Mentype® **AMLplex^{QS}**.

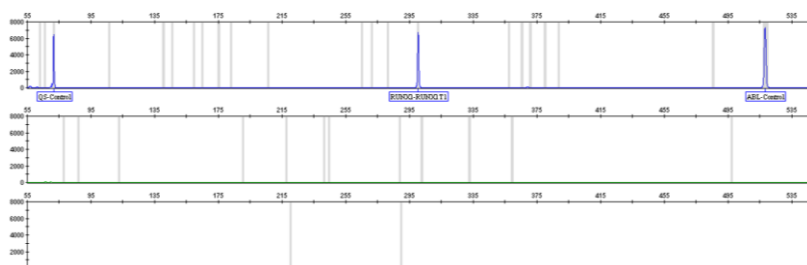


Figura 9 Electroforegrama del Control cDNA KAS-1, analizado en ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, eje y 55-550 bp, eje x 0-8.000 RFU

10.2.5 Comprobación del control negativo

Compruebe que el electroforegrama no contenga ningún pico específico superior a 200 RFU para una translocación (canal azul, verde, amarillo).

Control No-Template: compruebe que solo el pico de control de QS tenga suficiente altura, pero no el pico de ABL-Control (Figura 10).

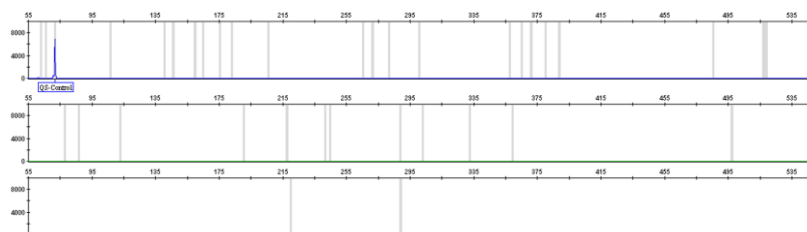


Figura 10 Electroforegrama de un Non Template Control, analizado en ABI 3500, GeneMapper ID-X 1.4, Template Files v3x, eje y 0-10.000 RFU, eje x 55-550 bp

Muestra de control negativo: compruebe que, con un ADNc conocido, negativo para las fusiones génicas y translocaciones a detectar, los picos de control de QS y ABL tengan suficiente altura (Figura 11).

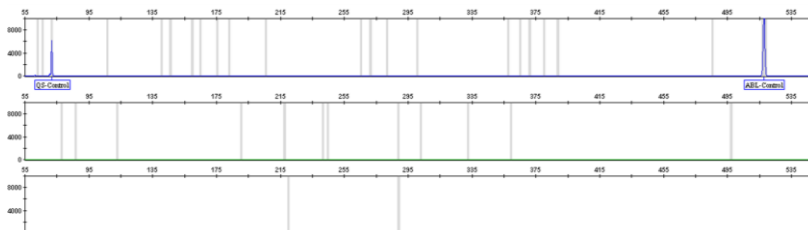


Figura 11 Electroforegrama de una muestra de control negativa, analizada en ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, eje y 0-10.000 RFU, eje x 55-515 bp

10.2.6 Evaluación de los datos de las muestras

Una vez comprobados los estándares de tamaño, la escalera alélica y las muestras de control tiene lugar la evaluación de los datos de las muestras.

Aviso: Mentype® **AMLplex^{QS}** es un ensayo puramente cualitativo. Se hace constar explícitamente que no es posible una evaluación cuantitativa, p. ej. en el marco de una determinación de MRD.

Utilizando los modelos de evaluación de Biotype GmbH y tras la evaluación correcta de la escalera alélica del análisis se señalan automáticamente los fragmentos de PCR detectados. Encontrará una sinopsis de las longitudes de los fragmentos de los productos PCR en Tabla 43.

Aviso: Mentype® **AMLplex^{QS}** ha sido validado y certificado con POP-4™. El uso de otro polímero (p. ej. POP-7™ o POP-6™) puede modificar el comportamiento de los productos de PCR específicos en el análisis. En determinadas circunstancias puede ser necesario adaptar las plantillas Biotype® (Panels y BinSet). Por favor, diríjase a nuestro servicio técnico (support@biotype.de). Se ha observado, además, que un cambio en el comportamiento de los restos de colorantes fluorescentes libres provoca mayor ruido de fondo.

Tabla 43 Longitudes de fragmentos de cada translocación en la escalera alélica del Mentype® **AMLplex**^{QS}, determinadas empleando POP-4™; † para la variante KMT2A-MLLT3_6A se esperan dos amplicones; * debido a la longitud variable del amplicón del PML-RARA_bcr2 (aprox. 173 bp) no es posible la calificación automática de la variante, pero si puede ser detectada con el cebador del Mentype® **AMLplex**^{QS}

Panel / translocación	Tamaño [bp]	Panel / translocación	Tamaño [bp]
Canal azul		Canal verde	
CBFB-MYH11_TypeG	63	DEK-NUP214	78
CBFB-MYH11_TypeI	66	KMT2A-PTD_e9e3	87
QS-Control	72	KMT2A-MLLT3_6A_S†	113
BCR-ABL_b2a3	107	KMT2A-MLLT3_6B	191
CBFB-MYH11_TypeJ	141	KMT2A-PTD_e10e3	218
CBFB-MYH11_TypeC	146	KMT2A-ELL_e10e3	242
CBFB-MYH11_TypeD	160	KMT2A-MLLT3_7A	245
CBFB_MYH11_TypeH	165	KMT2A-ELL_e10e2	289
CBFB_MYH11_TypeF	175	KMT2A-MLLT4	303
BCR-ABL_b3a3	183	KMT2A-PTD_e11e3	333
BCR-ABL_e1a3	206	KMT2A-MLLT3_8A	360
MLLT10_240-PICALM_2092	265	KMT2A-MLLT3_6A_L†	498
CBFB-MYH11_TypeA	271	Canal amarillo	
BCR-ABL_b2a2	282	PML-RARA_bcr1	220
RUNX1-RUNX1T1	301	PML-RARA_bcr3	288
BCR-ABL_b3a2	358	<i>PML_RARA_bcr2*</i>	
CBFB-MYH11_TypeE	365		
MLLT10_240-PICALM_1987	371		
BCR-ABL_e1a2	380		
NPM1-MLF1	389		
CBFB-MYH11_TypeB	486		
ABL-Control	518		

11. Troubleshooting

Gracias a la evaluación post-PCR descrita más arriba, la calificación automática de los alelos garantiza una diferenciación exacta y fiable de las transcripciones genéticas de fusión y sus variantes. Por favor, compruebe la correcta calificación de los alelos en la escalera alélica de cada proceso.

11.1 Límite de detección

En los ensayos con plásmidos se ha determinado un límite de detección ≤ 1.000 copias para 32 de 34 variantes de transcripción con 25 ciclos. Las variantes de transcripción CBF-MYH11_tipo C y KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6) difieren de ello. Con 28 ciclos se pueden determinar 1.000 copias de CBF-MYH11_tipo C y 10.000 copias de KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6). Si se dispone de las copias indicadas, se pueden alcanzar picos >200 RFU .

Esta aplicación es una herramienta de diagnóstico basada en PCR que ha sido desarrollada, validada y certificada para la clasificación de subtipos de AML. No es apta para la cuantificación o la monitorización de una enfermedad residual mínima (MRD por sus siglas en inglés).

11.2 Superposición (Pull-up Peaks)

Se pueden producir superposiciones entre los paneles de color cuando se ha empleado una matriz inadecuada para el análisis o las alturas de los picos del producto de PCR se sitúan fuera del rango de detección lineal del equipo. Estas se presentan en la misma posición que los picos específicos en otros paneles de color (por regla general con bajas intensidades de señal).

Aviso: si es necesario, diluya los productos PCR antes de la electroforesis capilar en gel para obtener resultados evaluables de forma inequívoca. Si se producen superposiciones a pesar de que las alturas de fluorescencia son óptimas se debería renovar la matriz.

11.3 Adherencia de nucleótidos independiente de la plantilla

Debido a su actividad transferasa terminal, la ADN polimerasa Multi Taq añade preferentemente una adenosina al extremo 3' del fragmento de ADN amplificado. Cuando el sistema de PCR no dispone de tiempo suficiente para la extensión o cuando las secuencias de cebadores no favorecen la extensión, no se produce esta adherencia. Este artefacto puede ser identificado por la aparición de un fragmento de base más corta (-1 bp peak). Todos los cebadores Biotype® están diseñados para minimizar esta formación de artefactos. También se reduce la formación del artefacto con el último paso de la extensión en el protocolo de PCR (68 °C durante 10 min.). La altura de pico del artefacto aumenta con cantidades de ADNc elevadas. Para evaluar los picos, cada laboratorio debería definir valores límite propios para ello.

11.4 Artefactos

La temperatura ambiente puede influir en gran medida en el comportamiento de los productos PCR en los sistemas capilares y provocar escalones o dobletes (split peaks) si la temperatura es demasiado baja. También puede afectar a la calificación automática de los alelos. Cuando se observen estos efectos, se recomienda inyectar de nuevo las muestras, eventualmente también con varias escaleras alélicas por análisis. Tenga en cuenta, por favor, que es necesario respetar la temperatura de trabajo recomendada por el fabricante del aparato. Las condiciones óptimas son >22 °C de temperatura ambiente.

11.5 Influencia del tipo de polímero

Mentype® **AMLplex^{QS}** ha sido validado y certificado con POP-4™. El uso de otro polímero (p. ej. POP-7™ o POP-6™) puede modificar el comportamiento de los productos PCR específicos en el proceso. En determinadas circunstancias puede ser necesario adaptar las plantillas Biotype® (Panels y BinSet). Por favor, dirijase a nuestro servicio técnico (support@biotype.de). Se ha observado, además, que un cambio en el comportamiento de los restos de colorantes fluorescentes libres provoca mayor ruido de fondo.

12. Información para pedidos

Tabla 44 Información detallada para los pedidos de los kits Mentype® **AMLplex^{QS}**

Kit	Tamaño	Número de pedido
Mentype® AMLplex^{QS}	10 reacciones	45-31220-0010
Mentype® AMLplex^{QS}	25 reacciones	45-31220-0025
Mentype® AMLplex^{QS}	100 reacciones	45-31220-0100
Mentype® AMLplex^{QS}	400 reacciones	45-31220-0400

13. Referencias

Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N (1991)

Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* 77(9): 2031-2036.

Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJM, Hokland P, Gabert J (2003)

Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17:2474-2486.

Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Gonzalez Diaz M, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A (1999)

Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease - Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13:1901-1928.

14. Marcas y exención de responsabilidad

Los nombres, marcas, etc. registrados utilizados en este documento no deben ser considerados como no protegidos aunque no estén marcados explícitamente como tales: Biotype[®], Mentype[®] (Biotype GmbH); ABI PRISM[®], GeneMapper[™], Hi-Di[™] Formamide, POP-4[™], POP-6[™], POP-7[™], Applied Biosystems[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.); FAM[™] (Life Technologies Ltd.).

Los kits Mentype[®] **AMLplex^{QS}** son kits con el marcado CE de conformidad con la Directiva europea 98/79/CE para los diagnósticos in vitro. Los kits no están disponibles como diagnósticos in vitro fuera de ese rango regulatorio.

15. Símbolos



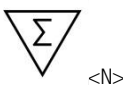
Fabricante



Fecha de fabricación



Designación de carga



Suficiente para <N> ensayos



Observar las instrucciones de uso (manual)



Fecha de caducidad



Rango de temperatura



Número de pedido



Diagnósticos en vitro

Verificación y validación de los kits de amplificación para PCR Mentype® AMLplex^{QS} PCR

A Validación analítica

A a) Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas de carga

Objetivos: determinar la reacción estándar y las tolerancias específicas de carga en relación a las alturas de señal absolutas (RFU), el equilibrio de las alturas de señal de la PCR múltiple y de la línea base. Así como, en función de los resultados, fijar los ajustes del sistema específicos del ensayo para la genotipificación por electroforesis capilar en gel (Bins y Panels), empleando los modelos de evaluación de los sistemas de secuenciación automática de ADN.

Método: el kit de ensayo incluye el ADNc de control de la línea celular KASUMI-1 (ACC220, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) que contiene la fusión genética AML1-ETO con la aberración cromosómica t(8; 21) (q22; q22) [7]. Se ha empleado, además, una mezcla molde equimolar de plásmidos artificial que contiene 33 de las 34 variantes a detectar. La reacción estándar fue ejecutada con el ADNc de control en la concentración de referencia de 250 ng por solución de PCR y 25 ciclos de PCR. La mezcla molde fue ajustada de tal modo que, tras 25 ciclos de PCR, se alcanzaron alturas de señal en el rango de medición lineal de los sistemas de análisis empleados (máx. 5000 RFU). Se ha llevado a cabo una determinación cuádruple con cuatro valores ciegos (no template control, NTC) sin ADN.

Resultados: para la mezcla de cargas específica del cebador para PCR se han determinado las especificaciones siguientes: utilizando un analizador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer se han alcanzado alturas de señal de 1.000-4.000 RFU y empleando un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer alturas de 1.000-5.000 RFU con el uso de la mezcla molde. Se han detectado señales específicas a partir de una altura de señal de 200 RFU. En el intervalo de escalonamiento no se han detectado señales inespecíficas en los valores ciegos (sin colorantes, artefactos) >200 RFU (línea base).

A b) Verificación de la fidelidad de medición

Objetivos: obtener información acerca de la fidelidad del método de medición y un resumen suficientemente detallado de los datos que permita valorar si el medio es adecuado para la determinar la fidelidad. Las mediciones de fidelidad son aplicables tanto para los ensayos cuantitativos como cualitativos únicamente si se dispone de una norma o método de referencia.

Método: el kit ha sido validado a través de la participación periódica en ensayos cooperativos, verificándose la fidelidad cualitativa de los resultados (diagnóstico). Biotype participa regularmente desde el 03/06/2013 en los ensayos cooperativos de United Kingdom National Quality Assessment Schemes (UKNEQAS, www.ukneqas.org.uk) para la detección de las translocaciones BCR-ABL y AML.

Esos ensayos tienen lugar periódicamente (2 veces) al año y son evaluados por organismos oficiales. Los resultados (Performance Status), también en comparación con los otros participantes, son enviados tras la participación.

Resultados: el "performance status" de Biotype es hasta ahora "green". Ha quedado demostrado que el producto es apto para la detección de variantes BCR-ABL y translocaciones de AML y, en comparación con otros métodos genéticos moleculares, arroja resultados correctos (cualitativos).

A c) Verificación de la especificidad analítica

A c) a) Verificación de la especificidad analítica en base a ADNc negativo pretipificado

Objetivos: las pruebas han servido para evitar resultados positivos erróneos consecuencia de una reactividad de interferencia y cruzada con los ADNc seleccionados de muestras negativas pretipadas (pacientes y donantes sanos).

Método: análisis de 22 ADNc pretipados como negativos para las variantes de translocación a detectar con el kit de ensayo. Las cantidades utilizadas debían cubrir el rango de las concentraciones esperables en la práctica clínica y ascendieron desde 145 ng hasta un máximo de 934 ng ADNc por solución de PCR con 25 ciclos.

Resultados: en el intervalo de alelos fijado por los Bins y Panels (plantillas) no se ha generado ninguna reactividad cruzada (>200 RFU). La señal de medición para el control interno de ADNc (gen ABL) superó >200 RFU en 21 ADNc, y en solo un caso aprox. 50 RFU. El valor límite para la calificación automática de alelos ha sido fijado en 200 RFU.

A c) b) Verificación de la especificidad analítica en base a ADNc positivo pretipado

Objetivos: las pruebas han servido para excluir resultados positivos erróneos consecuencia de una reactividad por interferencia y cruzada del cebador con los ADNc seleccionados de pacientes positivos pretipados.

Método: análisis de 20 ADNc pretipados como positivos para las variantes de translocación a detectar con el kit de ensayo. La cantidad utilizada fue fijada en 250 ng cDNA por solución de PCR. El programa de PCR ha sido ejecutado con 25 ciclos.

Resultados: se ha podido detectar claramente todas las mutaciones somáticas predeterminadas. No se ha establecido ninguna reactividad cruzada (>50 RFU) en el intervalo de los alelos. Las señales de medición para las mutaciones somáticas y el control con ADNc interno (gen ABL) superaron >200 RFU en 16 muestras sobre 20 muestras y >50 RFU en 3 muestras sobre 20. Una muestra alcanzó únicamente valores inferiores a 50 RFU, si bien aún era detectable la variante del gen de fusión. El valor límite para la calificación automática de alelos ha sido fijado en 200 RFU.

A d) Verificación de la sensibilidad analítica

Objetivos: estas pruebas han servido para determinar el límite analítico demostrable de los ensayos (sensibilidad).

Método: análisis de una serie diluida con 1 µg hasta 31,25 ng de ADNc de referencia (Kasumi-1) en una determinación cuádruple. El programa de PCR ha sido ejecutado con 25 ciclos. Además, para cada variante de transcripción a detectar, se han analizado series diluidas de un molde de referencia de fabricación artificial (plásmidos, GeneArt, Life Technologies) con un número de copias definido en una determinación doble.

Resultados: hasta una concentración de ADNc de 62,5 ng se ha podido detectar intensidades de señal >200 RFU, tanto para la translocación específica como también para el control de ABL. Con 31,25 ng las intensidades de señal de la variante específica alcanzaron >200 RFU y del control ABL >50 RFU. Valores óptimos en relación al intervalo de medición del secuenciador capilar se alcanzaron en el rango de 150 ng – 250 ng. Las mediciones de los diluidos de plásmidos arrojaron que se puede alcanzar un límite de detección >200 RFU de 100-1000 copias para todas las variante de translocación.

A e) Verificación de diferentes termocicladores de PCR

Objetivos: los termocicladores de diferentes marcas se diferencian en sus especificaciones. Pueden ser diferentes velocidades de calentamiento y enfriamiento o diferentes técnicas de regulación de la temperatura.

Método: realización de ensayos de reacciones estándar con ADN de control en la concentración de 250 ng con los termocicladores siguientes en determinaciones cuádruples con la misma mezcla maestra y 2 muestras ciegas sin ADN: termociclador Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG, Hamburg), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 con bloque de plata (Life Technology GmbH, Darmstadt), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 con bloque de aluminio (Life Technology GmbH, Darmstadt).

Resultados: en todos los tipos de amplificadores se ha podido constatar una correcta calificación de todos los productos amplificados. Todos los fragmentos de la mezcla molde han sido amplificados correctamente.

A f) Verificación de la influencia de diferentes temperaturas de alineamiento en la PCR

Objetivos: para determinar la robustez de las PCR se han simulado oscilaciones de temperatura en la etapa de adición de cebador (alineamiento) de la PCR múltiple. Esa fase de temperatura es crítica para la sensibilidad y especificidad de las PCR.

Método: variación de ± 1 °C y ± 2 °C en la temperatura de alineamiento específica del kit de 60 °C para la reacción estándar con ADN de control en la concentración nominal de 250 ng. Le siguió una determinación triple con la misma mezcla maestra.

Resultados: el kit es estable en torno a la temperatura de alineamiento especificada con oscilaciones técnicas del sistema de ± 1 °C. Se han alcanzado alturas de señal óptimas en todos los sistemas con la temperatura de alineamiento de 61 °C.

A g) Verificación de diferentes cargas tampón de PCR

Objetivos: las relaciones de concentración de los ingredientes en la mezcla de reacción tampón A para la PCR (dNTPs, concentración iónica, en particular Mg^{2+}) son decisivas para la sensibilidad, la especificidad y el equilibrio de las señales en la PCR múltiple. Por eso se ha verificado la robustez del ensayo frente a las oscilaciones de las cargas del tampón para PCR suministrado.

Método: prueba de 3 cargas REM-A independientes en la reacción estándar con ADN de control, en la concentración nominal de 250 ng, así como de la escalera alélica y de una línea de ADNc con expresión débil (MLL-AF6).

Resultados: cada carga REM A creada nueva es analizada con el kit de amplificación Mentype® **AMLplex^{QS}**. La autorización de la carga REM A solo se produce cuando los resultados obtenidos con el Mentype® **AMLplex^{QS}** se encuentran dentro de la especificación.

A h) Caducidad después de abierto

Objetivos: probar la estabilidad de los reactivos del kit PCR tras la repetición de fases de congelación y descongelación.

Método: someter a los reactivos del kit a 20 ciclos de congelación y descongelación. La congelación se ha realizado durante al menos 1 h a -20 °C. La descongelación se ha efectuado a temperatura ambiente y los reactivos han sido homogeneizados antes del uso mediante agitación. Finalmente se ha ejecutado una reacción estándar con ADN de control en la concentración nominal de 250 ng y valores ciegos adicionales sin ADN en determinaciones triples. La evaluación se realizó mediante la comparación con una reacción estándar sin ciclos de congelación y descongelación.

Resultados: la desviación de las alturas promedio de los picos en comparación con la reacción estándar fue de un máximo del 20% (sobre todo pérdida de señal). En los valores ciegos no se constataron picos adicionales >50 RFU dentro del intervalo de escalonamiento.

B Datos de rendimiento clínico**B a) Toma de muestras, aspectos éticos y regulatorios**

Se ha llevado a cabo un control para evaluar el rendimiento según los artículos 20 a 24 de la Ley alemana de productos médicos (DE). El Instituto Federal de Fármacos y Productos Médicos ha otorgado la exención de aprobación obligatoria para productos médicos con bajo riesgo para la seguridad según el artículo 7 del reglamento relativo a controles clínicos de productos médicos. Había constancia de voto aprobatorio de la comisión ética competente y de declaraciones de consentimiento de los pacientes.

Se ha empleado sangre entera venosa de 297 pacientes y de 10 personas de experimentación sanas.

B b) Ensayo comparativo

El objetivo primario es determinar las sensibilidades y especificidades del diagnóstico en comparación con los métodos de referencia. Para una selección de las translocaciones se disponía de métodos citogenéticos estandarizados (cariotipo, análisis FISH) [8]. Para las translocaciones que no podían ser representadas por métodos citogenéticos se han empleado ensayos PCR monoplex-nested validados y establecidos [9, 10].

B c) Extracción de ADN y purificación

Mediante centrifugación con gradiente de densidad se han obtenido células mononucleares (MNC) a partir de sangre entera heparinizada. A continuación se ha obtenido el ARNm completo empleando los kits de extracción de ARNm comerciales (RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). A partir de ese se ha sintetizado el ADNc también con kits comerciales (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). La calidad del ADNc ha sido verificada por medio de una Realtime-PCR (In-House-Test validado). Cada gen de fusión individual o mutación ha sido comprobado con PCR individuales validadas.

B d) Resultados

El kit de amplificación de PCR Mentype® **AMLplex^{QS}** no ha localizado ninguna mutación en el ADNc de las 10 personas de experimentación. Esos resultados no han sido considerados en los otros cálculos de resultados. A continuación se han analizado 297 muestras de pacientes. 5 de ellas no pudieron ser evaluadas (señal de control para ABL inferior al valor umbral recomendado). De las 292 muestras restantes, 199 fueron identificadas correctamente como negativas en comparación con el cariotipado, FISH y/o la PCR de control. 56 de las muestras negativas correctas mostraron en el cariotipo modificaciones genéticas (anomalías cromosómicas) que no han podido ser detectadas con el kit de ensayo. Esto se explica porque, si bien es cierto que el kit de amplificación de PCR Mentype® **AMLplex^{QS}** contiene las translocaciones más frecuentes, solo cubre un 37% de las anomalías genéticas más observadas en la AML [8]. Los

resultados de las diferentes pruebas de verificación están recogidos en la tabla 45.

En conjunto se ha obtenido una sensibilidad de diagnóstico del 94% y una especificidad de diagnóstico del 99,5%. Con la PCR de control [9, 10] se ha podido confirmar inequívocamente los diagnósticos citogenéticos verificados.

Tabla 45: Resultados de las pruebas de evaluación de rendimiento

Fusión genética	Biomarcador		Evaluación de rendimiento de pruebas clínicas (n=292)						
	Aberración cromosómica	Variante	Prevalencia [%] *	Correcta positiva	Correcta negativa	Errónea positiva	Errónea negativa	Sensibilidad de diagnóstico [%]	Especificidad de diagnóstico [%]
RUNX1 - RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22)	NA	7	14	277	0	1	93.3	100.0
BCR-ABL	t(9;22) (q34;q11)	e1a3 e1a2 b3a2 b3a3 b2a2 b2a3	1	1	291	0	0	100.0	100.0
PICALM-MLLT10	t(10;11) (p13;q14)	MLLT10_2 40- PICALM_1 987 MLLT10_2 40- PICALM_2 092	1	0	262	0	0	NA	100.0
CBFB-MYH11	inv(16) (p13;q22)	Tipo A Tipo B Tipo C Tipo D Tipo E Tipo F Tipo G Tipo H Tipo I Tipo J	5	25	264	1	2	92.6	99.6
DEK-NUP214	t(6;9) (p23;q34)	NA	1	3	289	0	0	100.0	100.0
KMT2A-MLLT4	t(6;11) (q27;q23)	NA	< 0.5	0	292	0	0	NA	100.0
KMT2A-MLLT3	t(9;11) (p22;q23)	6A_(THP-1) 7A_(10A) 8A_(MM6) 6B_(9B)	1	4	287	0	1	80.0	100.0
KMT2A-ELL	t(11;19) (q23;p13.1)	e10e2 e10e3	1	0	291	0	1	0	100.0
KMT2A-PTD	Partial Tandem Duplication	e9e3 e10e3 e11e3	5-7	23	269	0	0	100.0	100.0
NPM1-MLF1	t(3;5) (q25.1;q34)	NA	< 0.5	1	291	0	0	100.0	100.0
PML-RARA	t(15;17) (q22;q21)	bcr1 (PR-L) bcr2 (PR-V) bcr3 (PR-S)	13	8	284	0	0	100.0	100.0
Total			37	79	207	1	5	94.0	99.5

B e) Bibliografía sobre biomarcadores y sus secuencias de ADN

Ponencias y citas de los bancos de datos de ADN

Thiede C. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics* 2004; 4: 177-87.

Mohr B, Koch R, Thiede C, Kroschinsky F, Ehninger G, Bornhäuser M. CD34+ cell dose, conditioning regimen and prior chemotherapy: factors with significant impact on the early kinetics of donor chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 949-54.

Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007 Jun;92(6):744-52. *PubMed PMID: 17550846.*

Huret JL, Dessen P, Bernheim A. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, year 2003. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 1;31(1):272-4. *PubMed PMID: 12520000; PubMed Central PMCID: PMC165573.*

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51. *Epub 2009 Apr 8. Review. PubMed PMID: 19357394.*

Bibliografía seleccionada sobre AML1-ETO, t(8;21)(q22;q22):

Licht JD. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene*. 2001 Sep 10;20(40):5660-79. *Review. PubMed PMID: 11607817.*

Lo Coco F, Piseigna S, Diverio D. The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. *Haematologica*. 1997 May-Jun;82(3):364-70. *Review. PubMed PMID: 9234595.*

Nucifora G, Rowley JD. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1995 Jul 1;86(1):1-14. *Review. PubMed PMID: 7795214.*

Richkind K, Hromas R, Lytle C, Crenshaw D, Velasco J, Roherty S, Srinivasiah J, Varella-Garcia M. Identification of two new translocations that disrupt the AML1 gene. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000 Oct 15;122(2):141-3. *Review. PubMed PMID: 11106827.*

Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia*. 2003 Jan;17(1):9-16. Review. PubMed PMID: 12529654.

Bibliografía seleccionada sobre BCR-ABL, t(9;22)(q34;q11):

Burmeister T, Reinhardt R. A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR-ABL fusion transcripts. *Leuk Res*. 2008 Apr;32(4):579-85. Epub 2007 Oct 24. PubMed PMID: 17928051.

Emilia G, Luppi M, Ferrari MG, Temperani P, Marasca R, Giacobbi F, Vaccari P, Bandieri E, Di Donato C, Carapezzi C, Torelli G. Chronic myeloid leukemia with thrombocytopenic onset may be associated with different BCR/ABL variant transcripts. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998 Feb;101(1):75-7. PubMed PMID: 9460506.

Jones D, Luthra R, Cortes J, Thomas D, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Hai S, Ravandi F, de Lima M, Kantarjian H, Jorgensen JL. BCR-ABL fusion transcript types and levels and their interaction with secondary genetic changes in determining the phenotype of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):5190-2. Epub 2008 Sep 22. PubMed PMID: 18809762; PubMed Central PMCID: PMC2597614.

Kim TD, Türkmen S, Schwarz M, Koca G, Nogai H, Bommer C, Dörken B, Daniel P, le Coutre P. Impact of additional chromosomal aberrations and BCR-ABL kinase domain mutations on the response to nilotinib in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2010 Apr;95(4):582-8. Epub 2009 Dec 16. PubMed PMID: 20015884; PubMed Central PMCID: PMC2857187.

Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1619-30. Epub 2008 Sep 30. Review. PubMed PMID: 18827185.

Bibliografía seleccionada sobre DEK-CAN, t(6;9)(p23;q34):

Soekarman D, von Lindern M, Daenen S, de Jong B, Fonatsch C, Heinze B, Bartram C, Hagemeijer A, Grosveld G. The translocation (6;9) (p23;q34) shows consistent rearrangement of two genes and defines a myeloproliferative disorder with specific clinical features. *Blood*. 1992 Jun 1;79(11):2990-7. PubMed PMID: 1586743.

Soekarman D, von Lindern M, van der Plas DC, Selli L, Bartram CR, Martiat P, Culligan D, Padua RA, Hasper-Voogt KP, Hagemeijer A, et al. Dek-can rearrangement in translocation (6;9)(p23;q34). *Leukemia*. 1992 Jun;6(6):489-94. PubMed PMID: 1602786.

Bibliografía seleccionada sobre CALM-AF10, t(10;11)(p13;q22):

Jones LK, Chaplin T, Shankar A, Neat M, Patel N, Samuel DP, Hill AS, Debernardi S, Bassini A, Young BD, Saha V. Identification and molecular characterisation of a CALM-AF10 fusion in acute megakaryoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2001 Jun;15(6):910-4. *PubMed PMID:* 11417476

Bibliografía seleccionada sobre CBFβ-MYH11, inv(16) (p13;q22):

Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk RF, Eiwen K, Du J, Bullinger L, Fröhling S, Reimer P, Rummel M, Derigs HG, Nachbaur D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Döhner K. Prognostic impact of minimal residual disease in CBFβ-MYH11-positive acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 10;28(23):3724-9. *Epub 2010 Jul 12. PubMed PMID:* 20625124.

Mühlematter D, Lafage-Pochitaloff M, Gabert J, Reiffers J, Bilhou-Nabera C, van Ommen GJ, Hagemeijer A, Breuning MH. Genomic acute myeloid leukemia-associated inv(16)(p13q22) breakpoints are tightly clustered. *Oncogene*. 1999 Jan 14;18(2):543-50. *PubMed PMID:* 9927211.

Roth CG, Contis L, Gupta S, Agha M, Safyan E. De novo acute myeloid leukemia with Philadelphia chromosome (BCR-ABL) and inversion 16 (CBFβ-MYH11): report of two cases and review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2011 Mar;52(3):531-5. *Epub 2011 Feb 1. Review. PubMed PMID:* 21281226

Bibliografía seleccionada sobre MLL-AF6, t(6;11)(q27;q23):

Prasad R, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Canaani O, Saito H, Huebner K, Gale RP, Nowell PC, Kuriyama K, et al. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res*. 1993 Dec 1;53(23):5624-8. *PubMed PMID:* 8242616.

Welborn JL, Jenks HM, Hagemeijer A. Unique clinical features and prognostic significance of the translocation (6;11) in acute leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993 Feb;65(2):125-9. *Review. PubMed PMID:* 8453597.

Bibliografía seleccionada sobre MLL-AF9, t(9;11)(q22;q23):

Giugliano E, Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Serra A, Wlodarska I, Emanuel B, Saglio G, Hagemeijer A. MLL-AF6 fusion resulting from a new three-way translocation t(6;11;7) in a patient with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2001 Oct;15(10):1674-6. *PubMed PMID:* 11587234.

Mitterbauer G, Zimmer C, Pirc-Danoewinata H, Haas OA, Hojas S, Schwarzingler I, Greinix H, Jäger U, Lechner K, Mannhalter C. Monitoring

of minimal residual disease in patients with MLL-AF6-positive acute myeloid leukaemia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Br J Haematol.* 2000 Jun;109(3):622-8. *PubMed PMID: 10886213.*

Strehl S, König M, Mann G, Haas OA. Multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening in childhood acute myeloblastic leukemia. *Blood.* 2001 Feb 1;97(3):805-8. *PubMed PMID: 11157501.*

Tanabe S, Zeleznik-Le NJ, Kobayashi H, Vignon C, Espinosa R 3rd, LeBeau MM, Thirman MJ, Rowley JD. Analysis of the t(6;11)(q27;q23) in leukemia shows a consistent breakpoint in AF6 in three patients and in the ML-2 cell line. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996 Apr;15(4):206-16. *PubMed PMID: 8703846.*

Bibliografía seleccionada sobre MLL-ELL, t(11;19)(q23;p13.1):

Huret JL, Brizard A, Slater R, Charrin C, Bertheas MF, Guilhot F, Hählen K, Kroes W, van Leeuwen E, Schoot EV, et al. Cytogenetic heterogeneity in t(11;19) acute leukemia: clinical, hematological and cytogenetic analyses of 48 patients--updated published cases and 16 new observations. *Leukemia.* 1993 Feb;7(2):152-60. *Review. PubMed PMID: 8426468.*

Mitani K, Kanda Y, Ogawa S, Tanaka T, Inazawa J, Yazaki Y, Hirai H. Cloning of several species of MLL/MEN chimeric cDNAs in myeloid leukemia with t(11;19)(q23;p13.1) translocation. *Blood.* 1995 Apr 15;85(8):2017-24. *PubMed PMID: 7718874.*

Bibliografía seleccionada sobre MLL-PTD, Partial Tandem Duplication:

Basecke J, Whelan JT, Griesinger F, Bertrand FE. The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2006 Nov;135(4):438-49. *Epub 2006 Sep 11. Review. PubMed PMID: 16965385.*

Pajuelo-Gómez JC, Cervera J, García-Casado Z, Mena-Durán AV, Valencia A, Barragán E, Such E, Bolufer P, Sanz MA. MLL amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Apr 15;174(2):127-31. *PubMed PMID: 17452254.*

Shih LY, Liang DC, Fu JF, Wu JH, Wang PN, Lin TL, Dunn P, Kuo MC, Tang TC, Lin TH, Lai CL. Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. *Leukemia.* 2006 Feb;20(2):218-23. *PubMed PMID: 16341046.*

Whitman SP, Ruppert AS, Marcucci G, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Vukosavljevic T, Powell BL, Carroll AJ, Kolitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood.* 2007 Jun

15;109(12):5164-7. Epub 2007 Mar 6. PubMed PMID: 17341662; PubMed Central PMCID: PMC1890839.

Bibliografía seleccionada sobre NPM1-MLF1, t(3;5)(q25.1;q34):

Arber DA, Chang KL, Lyda MH, Bedell V, Spielberger R, Slovak ML. Detection of NPM/MLF1 fusion in t(3;5)-positive acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Hum Pathol.* 2003 Aug;34(8):809-13. PubMed PMID: 14506644.

Yoneda-Kato N, Look AT, Kirstein MN, Valentine MB, Raimondi SC, Cohen KJ, Carroll AJ, Morris SW. The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene.* 1996 Jan 18;12(2):265-75. PubMed PMID: 8570204.

Bibliografía seleccionada sobre PML-RARA, t(15;17)(q22;q21):

Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi PP, Longo L, Mencarelli A, Giacomucci A, Rocchi M, Biondi A, Rambaldi A, Lo Coco F, et al. Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 1;88(5):1977-81. PubMed PMID: 1848017; PubMed Central PMCID: PMC51149.

Pandolfi PP, Alcalay M, Fagioli M, Zangrilli D, Mencarelli A, Diverio D, Biondi A, Lo Coco F, Rambaldi A, Grignani F, et al. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* 1992 Apr;11(4):1397-407. PubMed PMID: 1314166; PubMed Central PMCID: PMC556589.

Otras referencias

- 1) **Wenz H, Robertson JM, Menchen S, Oaks F, Demorest DM, Scheibler D, Rosenblum BB, Wike C, Gilbert DA, Efcavitch JW.** High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Res* 1998; 8: 69-80.
- 2) **Sgueglia JB, Geiger S, Davis J.** Precision studies using the ABI prism 3100 genetic analyzer for forensic DNA analysis. *Anal Bioanal Chem* 2003; 376: 1247-54.
- 3) **Gilder JR, Doom TE, Inman K, Krane DE.** Run-specific limits of detection and quantitation for STR-based DNA testing. *J Forensic Sci* 2007; 52: 97-101.
- 4) **Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S.** A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007; 92: 744-52.

- 5) **Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD.** The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51.
- 6) **Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, Guignard JC, Jacquemot-Perbal MC, Labarussias M, Leberre V, Malo A, Morel-Pair C, Mossafa H, Potier JC, Texier G, Viguié F, Yau Chun Wan-Senon S, Zasadzinski A, Dessen P.** Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue): D920-4.
- 7) **Kozu T, Miyoshi H, Shimizu K, Maseki N, Kaneko Y, Asou H, Kamada N, Ohki M.** Junctions of the AML1/MTG8(ETO) fusion are constant in t(8;21) acute myeloid leukemia detected by reverse transcription polymerase chain reaction. *Blood* 1993; 82: 1270-6.
- 8) **Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group.** Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116: 354-65.
- 9) **Steudel C, Wermke M, Schaich M, Schäkel U, Illmer T, Ehninger G, Thiede C.** Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37: 237-51.
- 10) **van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A.** Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.

Notas

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

info@biotype.de

www.biotype.de