Instrucciones de uso

Imegen® Quimera Screening Multiplex I

Ref. IMG-116-24

CE IVD

Fabricado por:
HEALTH IN CODE, S.L.
Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España
+34 963 212 340 – info@healthincode.com

healthincode.com

Código: HIC-PT-KIT 03-F-03 V.02

healthincode

Health in Code S.L. le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

Nuestros productos están diseñados para diagnóstico *in vitro*. Health in Code S.L. no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Health in Code S.L., respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. Health in Code S.L. no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Health in Code S.L. son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I para qPCR ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con el Departamento Técnico:

+34 963 212 340
tech.support@healthincode.com

Imegen® *es una marca registrada de Health in Code S.L. en España.*

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)		
Versión 05	AGO 2023	Se renombra la enzima en los apartados 6 y 7.
Versión 04	MAR 2023	Incorporación del apartado 11. Características del rendimiento.
Versión 03	DIC 2022	Cambio de dirección del fabricante: Health in Code S.L., Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España.
Versión 02	SEP 2022	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a HEALTH IN CODE, S.L.
Versión 01	MAY 2022	Adaptación a los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.

índice

01 **Información general** 4

02 **Uso previsto** 6

03 **Características técnicas** 7

04 **Advertencias y precauciones** 9

05 **Contenido y condiciones de almacenamiento del kit** 10

06 **Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran** 11

07 **Protocolo de ensayo** 13

07.1 | Preparación de los reactivos 13

07.2 | Preparación de las reacciones de amplificación 13

07.3 | Configuración del programa de la PCR a tiempo real 14

08 **Análisis de los resultados** 16

09 **Troubleshooting** 18

10 **Limitaciones** 19

10.1 | Equipos 19

10.2 | Reactivos 19

10.3 | Estabilidad del producto 19

11 **Características de rendimiento** 20

11.1 | Muestras de validación 20

11.2 | Linealidad y eficiencia 20

11.3 | Límite de detección (LOD) 20

11.1 | Repetibilidad y reproducibilidad 21

01 Información general

El análisis de quimerismos moleculares resultantes de un trasplante alogénico se ha convertido en un método bien establecido para controlar la evolución del trasplante, puesto que ofrece una información precisa y valiosa que permite orientar el tratamiento o intervención posteriores al trasplante, con el objetivo de anticipar un posible riesgo de recaída, rechazo o enfermedad de injerto contra huésped. Asimismo, permite evaluar la respuesta a diferentes modalidades de tratamiento.

Toda la familia de kits Imegen®-Quimera para qPCR ha sido desarrollada en colaboración con el Hospital Regional Universitario de Málaga incluido en el Servicio Andaluz de Salud (SAS). Fruto de este acuerdo, Health in Code S.L., posee una **licencia exclusiva y mundial** sobre el *know-how* de los productos para la fabricación y explotación comercial de los mismos.

Referencias

- *Jiménez-Velasco A, Barrios M, Román-Gómez J, Navarro G, Buño I, Castillejo JA, Rodríguez AI, García-Gemar G,Torres A, Heiniger AII. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. Leukemia. 2005; 19(3):336-43. Doi: 10.1038/sj.leu.2403622. PMID:15674363.*

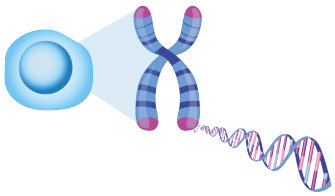
- *Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemasn J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitaive real-time PCR experiments. Clin Chem 2009 Apr; 55(4):611-22. Doi: 10.1373/clinchem.2088.112797.Epub 2009 Feb 26. PMID 19246619.*

Procedimiento de análisis de quimerismos hematopoyéticos:

1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

1h

ADN genómico extraído a partir de muestras de sangre periférica o médula ósea.



2. SCREENING DE POLIMORFISMOS INFORMATIVOS

2h30'

Un ensayo de genotipado permite identificar un polimorfismo informativo adecuado para el seguimiento del paciente.

3. SELECCIÓN DEL MARCADOR PARA EL SEGUIMIENTO DEL PACIENTE

10'

En casos de trasplante de células madre hematopoyéticas, se considera que un polimorfismo es informativo cuando se detecta en el receptor y no en el donante.

MARCADOR		RECEPTOR	DONANTE	INFORMATIVO
Q116-6I	[FAM]	+ −	+ −	✗
Q116-3I	[VIC]	+ −	+ −	✗
Q116-7I	[FAM]	+ −	+ −	✓
Q116-12D	[VIC]	+ −	+ −	✗

4. CUANTIFICACIÓN DEL MARCADOR DE SEGUIMIENTO

dPCR 4h
qPCR 2h30'

El quimerismo molecular se cuantifica a partir del número de copias del marcador informativo respecto al número de copias del gen de referencia (β-globina).

5. SEGUIMIENTO DEL QUIMERISMO HEMATOPOYÉTICO EN EL PACIENTE

10'

En el seguimiento se representan los valores de quimerismo hematopoyético para estudiar la evolución del paciente trasplantado a lo largo del tiempo.

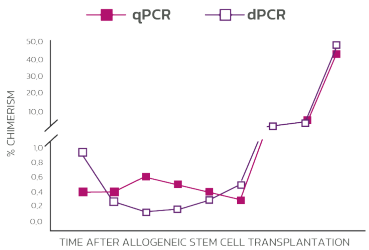


Figura 1. Procedimiento de análisis de quimerismos hematopoyéticos

02 Uso previsto

El kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I permite la selección de marcadores informativos para el seguimiento de pacientes con trasplante de células hematopoyéticas mediante el análisis simultáneo de 16 polimorfismos de inserción/deleción (INDEL) en 8 reacciones independientes por PCR multiplex a tiempo real. Se considera que un polimorfismo es informativo cuando se detecta en el receptor del trasplante y no en el donante.

Para determinar la informatividad de los marcadores SRY y RhD no es necesario hacer un análisis molecular. El marcador SRY es informativo cuando el receptor es varón y la donante es mujer y el RhD cuando el receptor tiene grupo sanguíneo Rh+ y el donante Rh-.

El kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I es para diagnóstico *in vitro* y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

03 Características técnicas

El kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I permite llevar a cabo un análisis de genotipado capaz de identificar marcadores informativos para el análisis de quimerismos hematopoyéticos. Emplea una combinación de oligonucleótidos específicos y sondas de hidrólisis fluorescentes para detectar la presencia o ausencia de 16 marcadores polimórficos, incluyendo marcadores INDELs y de alelos nulos. Junto con Imegen® Quimera Screening Multiplex II, el marcador SRY, presente en el Chr Y, y el RhD, incluye un total de 34 marcadores.

↘ 34 marcadores en 18 cromosomas

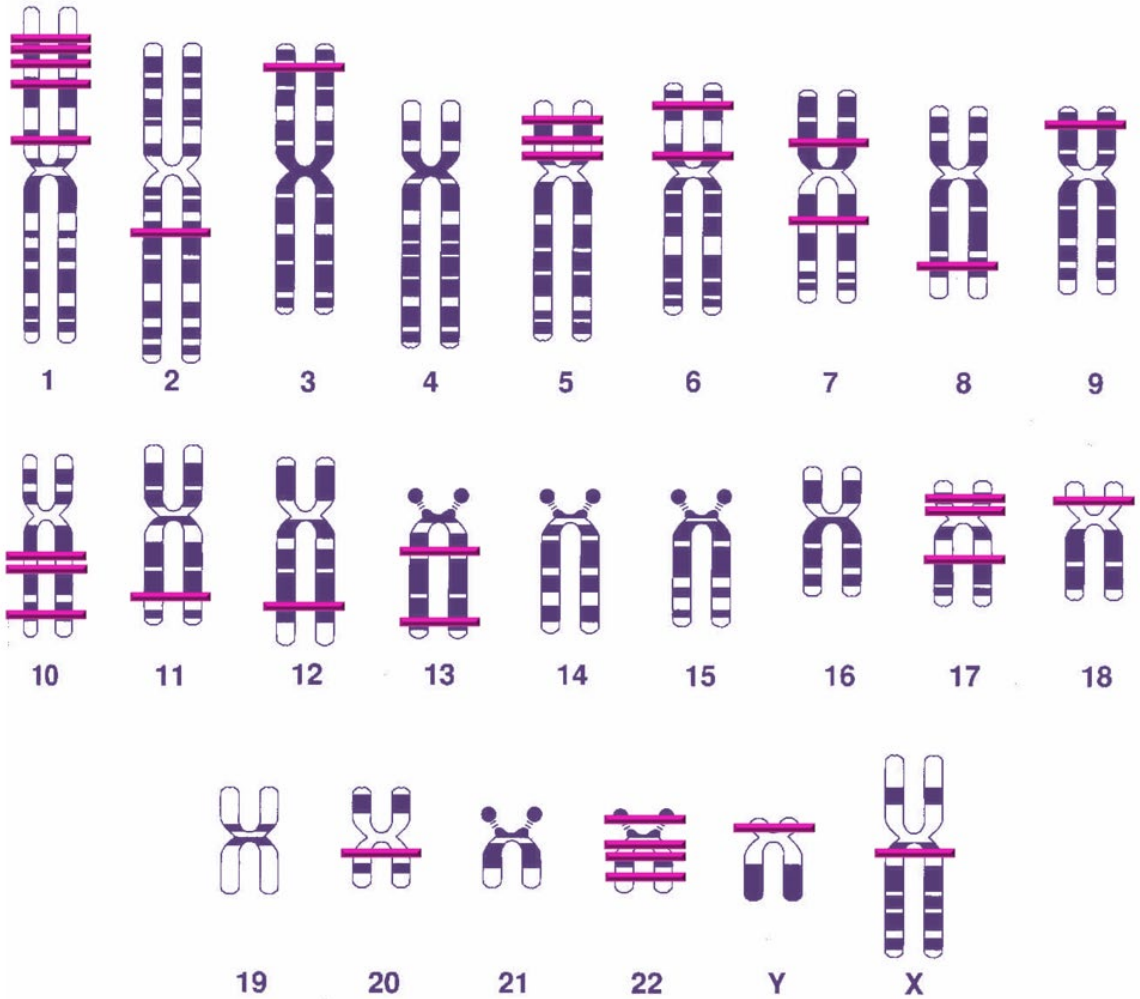


Figura 2. Representación cromosómica de los biomarcadores incluidos en los ensayos de genotipado y seguimiento de quimerismos

El material necesario para este estudio es ADN genómico procedente, de sangre periférica o médula ósea de muestras humanas. La cantidad total de ADN necesario es 450 ng de muestra de receptor pre-trasplante y 450 ng de muestra de donante.

IMG-116-24 Screening Multiplex I

Nombre del Biomarcador	Posición Cromosómica
3I	20q11.22
6I	10q26.2
12D	5p13.2
7I	Xq28
11I	1p13.3
5I	10q21.2
4I	17p13.2
10I	22q13.32
23I	13q34
9I	22q11.22
8I	22p13
12I	5p13.3
4D	17p13.2
5D	10q21.2
10D	22q13.32
20I	8q24.22

IMG-116-74 Screening Multiplex II

Nombre del Biomarcador	Posición Cromosómica
33I	1p36.13
37I	5p15.32
38I	6p12.3
44I	13q14.11
43I	12q24.21
49I	2q21.2
39I	7p12.3
50I	1p36.11
46I	9p23
47I	11q23.2
32I	3p25.3
31I	6p21.2
29D	17q21.31
30D	7q21.3
27D	18p11.22
24I	1p34.1

↘ Marcadores adicionales

Nombre del Biomarcador	Posición Cromosómica
SRY	Yp11.2
RhD	1p36.11

Tabla 1. Posición cromosómica de los biomarcadores.

El funcionamiento clínico de este kit ha sido validado empleando ADN genómico extraído a partir de sangre periférica o médula ósea de muestras humanas.

La informatividad acumulada de este panel, junto con los marcadores SRY y RhD es del 96%. En caso de analizar también el panel de marcadores incluidos en Imegen® Quimera Screening Multiplex II, la informatividad acumulada es 99.96%.

04 Advertencias y precauciones

- Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
- No pipetear con la boca.
- No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
- Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
- No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
- En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
- Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
- Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme lo establecido por la EU-OSHA, agencia de información de la Unión Europea para la seguridad y la salud en el trabajo, sobre Bioseguridad de nivel 2, aplicables a laboratorios clínicos de diagnóstico donde se manipulan microrganismos de amplio espectro, de moderado riesgo y asociados a enfermedades humanas de diversa severidad.
- Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
- Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.
- El fabricante no responde frente al mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por Health in Code S.L.
- El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por Health in Code S.L. por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.

05 Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para analizar 10 muestras diferentes de ADN genómico o 5 casos receptor/donante.

El kit consta de una tira de 8 tubos que contiene un Máster de *Screening* en cada tubo. Cada Máster está formado por dos parejas de oligonucleótidos y dos sondas TaqMan®-MGB con distintos marcajes (FAM™ o VIC™) para el análisis simultáneo de dos polimorfismos distintos (Tabla 2).

Tubo	Reacciones	Marcadores	Conservación	Rehidratación
1	10 Reacciones	Q116-6I Q116-3I	4°C	33 µL de agua/vial*
2	10 Reacciones	Q116-11I Q116-10D	4°C	33 µL de agua/vial*
3	10 Reacciones	Q116-4I Q116-5D	4°C	33 µL de agua/vial*
4	10 Reacciones	Q116-5I Q116-4D	4°C	33 µL de agua/vial*
5	10 Reacciones	Q116-10I Q116-20I	4°C	33 µL de agua/vial*
6	10 Reacciones	Q116-7I Q116-12D	4°C	33 µL de agua/vial*
7	10 Reacciones	Q116-12I Q116-9I	4°C	33 µL de agua/vial*
8	10 Reacciones	Q116-8I Q116-23I	4°C	33 µL de agua/vial*

Tabla 2. Componentes del kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I y temperatura de conservación

(*) Una vez rehidratados, los reactivos deberán conservarse a -20°C.

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real
- Micropipetas (10 µL, 20 µL y 200 µL)
- *Vortex*

Reactivos:

- Agua libre de nucleasas
- *Master Mix* de *PCR Hot Start* (*TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0,* ThermoFisher Scientific)

Materiales:

- Placas ópticas de 96 pocillos o tubos ópticos de 0.2 mL
- Film óptico para placa de 96 pocillos o tapas ópticas para tubos de 0.2 mL
- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL y 200 µL)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Guantes de látex sin polvo

Kits complementarios

Se recomienda, en caso de no identificar ningún marcador informativo, el uso del kit Imegen® Quimera Screening Multiplex II (IMG-116-74), que ofrece 16 marcadores alternativos.

Una vez identificado un polimorfismo como informativo, se recomienda adquirir su kit correspondiente de Imegen®-Quimera para qPCR (Tabla 3), para llevar a cabo el seguimiento del paciente, el análisis del órgano trasplantado y la evaluación del riesgo de recaída. Los kits Imegen®-Quimera para qPCR permiten cuantificar de manera absoluta la cantidad de marcador informativo (quimerismo) o de manera relativa la cantidad total de ADN genómico, empleando un gen de referencia (β-globina). El gen de referencia se analiza en una reacción independiente que sirve como control de la calidad y cantidad de ADN de la muestra analizada.

Nombre del kit	Referencia
Imegen® Quimera SRY	IMG-116-2
Imegen® Quimera RhD	IMG-116-18
Imegen® Quimera Q116-3I	IMG-116-3
Imegen® Quimera Q116-4I	IMG-116-4
Imegen® Quimera Q116-5I	IMG-116-5
Imegen® Quimera Q116-6I	IMG-116-6
Imegen® Quimera Q116-7I	IMG-116-7
Imegen® Quimera Q116-8I	IMG-116-8
Imegen® Quimera Q116-9I	IMG-116-9
Imegen® Quimera Q116-10I	IMG-116-10
Imegen® Quimera Q116-11I	IMG-116-11
Imegen® Quimera Q116-12I	IMG-116-12
Imegen® Quimera Q116-4D	IMG-116-13
Imegen® Quimera Q116-5D	IMG-116-14
Imegen® Quimera Q116-10D	IMG-116-17
Imegen® Quimera Q116-23I	IMG-116-23
Imegen® Quimera Q116-20I	IMG-116-20
Imegen® Quimera Q116-12D	IMG-116-21
Imegen® Quimera Q116-33I	IMG-116-16
Imegen® Quimera Q116-37I	IMG-116-75
Imegen® Quimera Q116-38I	IMG-116-76
Imegen® Quimera Q116-44I	IMG-116-77
Imegen® Quimera Q116-43I	IMG-116-78
Imegen® Quimera Q116-49I	IMG-116-79
Imegen® Quimera Q116-39I	IMG-116-80
Imegen® Quimera Q116-50I	IMG-116-70
Imegen® Quimera Q116-46I	IMG-116-66
Imegen® Quimera Q116-47I	IMG-116-81
Imegen® Quimera Q116-32I	IMG-116-82
Imegen® Quimera Q116-31I	IMG-116-83
Imegen® Quimera Q116-30D	IMG-116-84
Imegen® Quimera Q116-29D	IMG-116-73
Imegen® Quimera Q116-27D	IMG-116-85
Imegen® Quimera Q116-24I	IMG-116-87

Tabla 3. Kits Imegen®-Quimera para seguimiento por PCR a tiempo real

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de los reactivos

Todos los reactivos incluidos en el kit están liofilizados. El primer paso consiste en rehidratar los reactivos que componen un kit, añadiendo 33 µL de agua libre de nucleasas/vial*. Para facilitar la resuspensión de cada componente, se recomienda agitar y dar un *spin* a los tubos que contienen los reactivos y conservarlos a 4°C durante una hora antes de su uso.

(*) Si los reactivos no van a ser utilizados tras la rehidratación, se recomienda conservarlos a –20°C.

07.2 | Preparación de las reacciones de amplificación

El ensayo deberá incluir las siguientes reacciones:

- Reacciones con la muestra del receptor.
- Reacciones con la muestra del donante.
- Reacción empleando el control negativo (reacción que contiene agua libre de nucleasas en lugar de ADN, para garantizar la ausencia de posible contaminación durante el proceso).

El análisis simultáneo de los 16 marcadores con el kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I requiere la preparación de ocho mixes diferentes de PCR. Cada *mix* de PCR está formado por:

- *Master Mix* del *Screening Multiplex I*
- *Master Mix* de *PCR Hot Start* (*TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0,* ThermoFisher Scientific)

A continuación, se especifica el protocolo recomendado para preparar las reacciones de amplificación:

01 Descongelar la tira de 8 tubos que contiene los *Masters* de *Screening*. Descongelar el ADN del receptor y del donante.

02 Agitar con *vortex* cada uno de los reactivos y mantener en frío.

03 Añadir 45 µL de *Máster Mix* de *PCR Hot Start* y 18 µL de ADN del receptor a 25 ng/µL en un tubo de 1.5mL.

04 Añadir 45 µL de *Máster Mix* de *PCR Hot Start* y 18 µL de ADN del donante a 25 ng/µL en un tubo de 1.5mL.

05 Agitar con *vortex* y pipetear 7 µL del *Máster Mix* con el ADN del receptor en 8 pocillos y 7 µL del *Máster Mix* con el ADN del donante en otros 8 pocillos.

06 Añadir 3 µL de *Máster* de *Screening* a cada pocillo (con ADN del receptor y con el ADN del donante).

NOTA: 50 ng es la concentración total de ADN recomendado por pocillo.

07.3 | Configuración del programa PCR a tiempo real

En función del equipo que se vaya a emplear para llevar a cabo la PCR a tiempo real, se deberá seguir las siguientes instrucciones para configurar el programa de amplificación.

Tubo	Marcadores	Inserción (Alelo +)	Deleción (Alelo –)	Marcaje	Emisor o Quencher
1	Q116-6I	X		FAM™	MGB
	Q116-3I	X		VIC™	
2	Q116-11I	X		FAM™	
	Q116-10D		X	VIC™	
3	Q116-4I	X		FAM™	
	Q116-5D		X	VIC™	
4	Q116-5I	X		VIC™	
	Q116-4D		X	FAM™	
5	Q116-10I	X		VIC™	
	Q116-20I	X		FAM™	
6	Q116-7I	X		FAM™	
	Q116-12D		X	VIC™	
7	Q116-12I	X		FAM™	
	Q116-9I	X		VIC™	
8	Q116-8I	X		VIC™	
	Q116-23I	X		FAM™	

Tabla 4. Información de las sondas incluidas en el kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I

7500 Fast o StepOne Plus Real-Time PCR system (Thermo Scientific)

- **Tipo de experimento**: Quantitation- Standard curve
- **Velocidad de rampa**: standard
- **Volumen de reacción**: 10 µL
- **Referencia basal ROX™**: incluída
- **Fluoróforos de las sondas TaqMan®**:
- **Programa óptimo**:

Campos	Etapa 1 Activación enzimática	Etapa 2 PCR	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	50 ciclos	
		Desnaturalización	Unión de cebadores / Extensión
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tiempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto*

Tabla 5. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne Plus

(*) Detección de la fluorescencia

LightCycler® 480 Real-Time PCR system (Roche)

- Programa óptimo:

Campos	Etapa 1 Activación enzimática	Etapa 2 PCR			Etapa 3
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	50 ciclos			1 ciclo final
		Desnat.	Unión de cebadores	Extensión	
Temperatura	95°C	95°C	60°C	72°C	40°C
Tiempo	10 minutos	5 segundos	10 segundos	15 segundos*	20 segundos

Tabla 6. Programa de PCR óptimo para LightCycler® 480.

(*) Detección de la fluorescencia

- Análisis: *Fit points* para todas las muestras

08 Análisis de los resultados

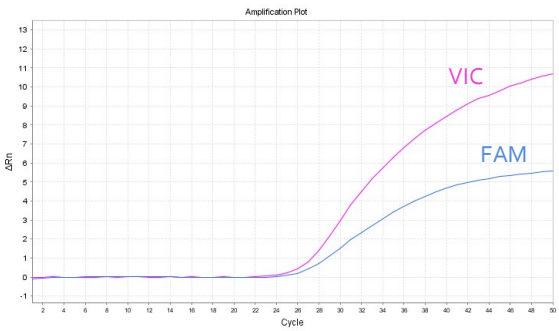
El análisis de los resultados se basa en la detección de un polimorfismo informativo, es decir, que se detecte en el receptor y no se detecte en el donante.

La Tabla 7 muestra los posibles resultados que se pueden obtener para un marcador evaluado. En la Figura 3 se representa gráficamente el resultado de dos marcadores multiplexados. El marcador perceptible con VIC es informativo en caso de trasplante de médula ósea, pero no en trasplante de órgano sólido (Tabla 7).

Reactivos	Resultados		Informatividad	
	Receptor	Donante	Médula Ósea	Órganos sólidos
Polimorfismo	+	+	No informativo	No informativo
Polimorfismo	+	–	Informativo	No informativo
Polimorfismo	–	–	No informativo	No informativo
Polimorfismo	–	+	No informativo	Informativo

Tabla 7. Interpretación de los posibles resultados obtenidos con Imegen® Quimera Screening Multiplex I

Receptor



Donante

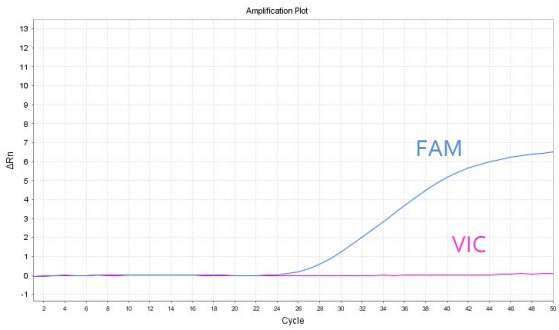


Figura 3. Resultados obtenidos en 7500 FAST Real-time PCR System para muestras de receptor y donante. Dos marcadores genéticos se multiplexan en cada reacción de PCR. Las curvas de amplificación azules representan la señal de amplificación en el canal FAM y las curvas de amplificación rosas representan la señal de amplificación en el canal VIC.

Para que el ensayo pueda considerarse válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

- No hay señal de amplificación del control negativo de PCR, ni en el canal FAM™ ni en el canal VIC™. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el análisis para descartar posible contaminación.
- Teniendo en cuenta que la evaluación de los biomarcadores se realiza bajo las mismas condiciones de PCR, se esperan valores de Ct similares. En caso de que alguno de los marcadores amplifique con ± 5 Ct de diferencia, se recomienda repetir el ensayo.
- Los biomarcadores que durante el *screening* amplifiquen en un Ct > 30, se

consideran NEGATIVOS, siempre que se hayan seguido las instrucciones de preparación, tipo y concentración de muestra de partida recomendadas en el presente manual.

- En caso de obtener resultados diferentes a los expuesto anteriormente, se recomienda consular el apartado 09 de este manual (*Troubleshooting*).

En caso de no obtener ningún marcador informativo, póngase en contacto con el departamento técnico: tech.support@healthincode.com.

Imegen®-Quimera software, by Health in Code S.L.

Health in Code S.L. ha diseñado y desarrollado una aplicación disponible para el usuario a través del departamento técnico (tech.support@healthincode.com) que le permite crear una base de datos de pacientes, así como, registrar los resultados del *screening* de polimorfismos informativos, las cuantificaciones del polimorfismo informativo de las distintas muestras del seguimiento de un paciente y las acciones médicas aplicadas a dicho paciente durante su seguimiento. Además, el usuario puede visualizar todas las acciones médicas, la evolución del paciente sobre un gráfico, y exportar los resultados.

Para más información, se recomienda acceder a un vídeo tutorial sobre el uso de la aplicación **Imegen®-Quimera**, disponible en el siguiente enlace: youtu.be/K38cV3hacm8

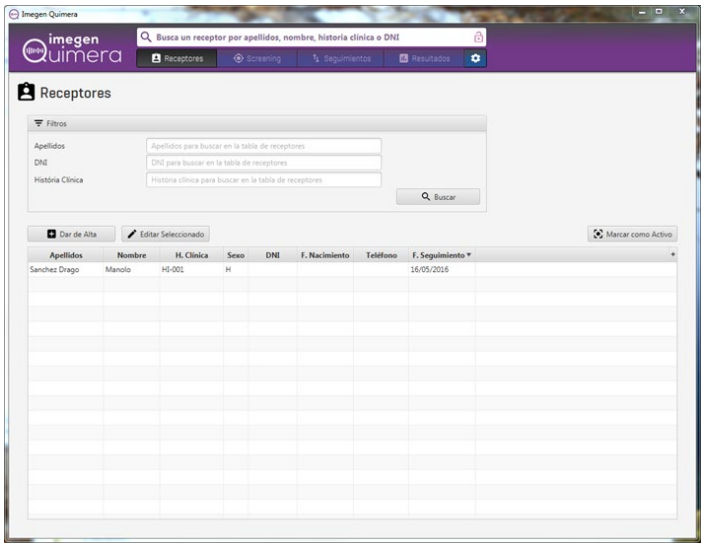


Figura 4. Vista de la aplicación de seguimiento de pacientes desarrollada por Health in Code S.L.

NOTA: La aplicación Imegen®-Quimera no está diseñado para utilizarse como un sistema de gestión de la información de laboratorio (LIMS).

09 Troubleshooting

La siguiente tabla 8, indica gráficamente los resultados que pueden obtenerse del análisis de los diferentes controles positivos y negativos y de una muestra de ADN genómico en un ensayo, así como su interpretación:

Control	C_T* Polimorfismo	Resultado	Causa
Muestra analizada	Detectado < 30	+	Resultado esperado
	Detectado > 30	+	Contaminación de la PCR con ADN humano [1], o concentración de la muestra inferior a la especificada en el protocolo [2]
	No detectado	–	Resultado esperado
Control negativo de PCR	No detectado	–	Resultado esperado
	Detectado	+	Contaminación de la PCR con ADN humano [1]

Tabla 8. Posibles resultados de los controles y muestras.

(*) Ct ciclo umbral (abreviatura del término en inglés cycle threshold).

(1) Contaminación de la PCR con ADN: la contaminación de las reacciones de PCR puede deberse a un error en el proceso de manejo de la muestra, contaminación de los reactivos o contaminación ambiental. Se recomienda limpiar minuciosamente el laboratorio donde se realizó el proceso de PCR, así como el equipo. Si es necesario, use nuevas alícuotas de los reactivos utilizados en la PCR y repita el ensayo.

(2) Concentración de la muestra inadecuada: una amplificación tardía de los marcadores puede deberse a que la concentración de ADN utilizada en el ensayo sea inferior a la especificada en el protocolo. En ese caso, se recomienda cuantificar la muestra de nuevo mediante absorbancia o fluorescencia.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

Imegen® Quimera Screening Multiplex I ha sido validado usando las siguientes equipos de PCR a tiempo real:

- *7500 FAST Real-Time PCR System* (ThermoFisher Scientific)
- *StepOne Plus Real-Time PCR System* (ThermoFisher Scientific)
- *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche)

Si usa otra marca o modelo de termociclador, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, póngase en contacto con el departamento técnico para cualquier consulta o aclaración.

10.2 | Reactivos

Imegen® Quimera Screening Multiplex I ha sido validado utilizando los reactivos incluidos en el kit. Se aconseja utilizar los reactivos de PCR recomendados por el proveedor del termociclador que se vaya a utilizar para los ensayos de PCR a tiempo real, no proporcionados por el fabricante del kit, como se indica en el apartado 06 de este manual (Equipos y materiales necesarios que no se suministran). En caso de duda, póngase en contacto con el departamento técnico.

10.3 | Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas, en este manual y dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.

11 Características de rendimiento

11.1 | Muestras de validación

El kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I está diseñado para el análisis de ADN genómico (ADNg) total. Los sistemas de qPCR para cada marcador del kit se han puesto a punto con 7 muestras de ADN sintético (plásmido). Además, estos resultados han sido validados con 31 muestras de referencia germinales que presentan el polimorfismo en homocigosis o heterocigosis, analizando la presencia o ausencia del mismo.

Para que una muestra pueda considerarse positiva, se ha establecido un ciclo umbral o Ct <30, siempre y cuando se hayan seguido las instrucciones de preparación, tipo y concentración de muestra de partida recomendadas en el presente manual.

11.2 | Linealidad y eficiencia

La linealidad del kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I se establece mediante una curva patrón a partir de diluciones seriadas de un calibrador sintético (plásmido) de concentración conocida, para cada uno de los marcadores genéticos. Los resultados obtenidos durante la validación con plásmidos (Tabla 9), confirman una adecuada eficiencia y linealidad (R^2 > 0,99) para la cuantificación de cada uno de los marcadores evaluados. Estos parámetros han sido valorados de acuerdo con las guías MIQE, *mínimum information for publication of quatitative ral-time PCR experiments* y la norma ISO 20395:2019 *Biotechnology-Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences-qPCR and dPCR*.

El valor de la eficiencia ($\overline{E}$) de cada marcador se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\overline{E} = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1$$

Nombre marcador	Parámetros					
	Marcador			β-Globina		
	Pendiente	R^2	$\overline{E}$	Pendiente	R^2	$\overline{E}$
Q116-8I	-3,25	0,99	1,93	-3,32	0,99	2,00
Q116-6I	-3,35	0,99	1,87	-3,32	0,99	2,00
Q116-11I	-3,51	0,99	1,92	-3,32	0,99	2,00
Q116-4I	-3,25	0,99	1,96	-3,32	0,99	2,00
Q116-5I	-3,15	0,99	1,99	-3,32	0,99	2,00
Q116-10I	-3,32	0,99	2,00	-3,32	0,99	2,00
Q116-7I	-3,35	0,99	1,94	-3,32	0,99	2,00
Q116-12I	-3,30	0,99	2,01	-3,32	0,99	2,00
Q116-3I	-3,32	0,99	2,01	-3,21	0,99	2,05
Q116-5D	-3,52	0,99	1,89	-3,21	0,99	2,05
Q116-4D	-3,60	0,99	1,98	-3,21	0,99	2,05
Q116-20I	-3,11	0,99	2,10	-3,21	0,99	2,05
Q116-12D	-3,35	0,99	2,04	-3,21	0,99	2,05
Q116-9I	-3,16	0,99	2,08	-3,21	0,99	2,05
Q116-23I	-3,25	0,99	1,96	-3,21	0,99	2,05
Q116-10D	-3,31	0,99	2,00	-3,21	0,99	2,05

Tabla 9. Resultados de los parámetros de linealidad y eficiencia obtenidos con los calibradores sintéticos para cada sistema qPCR. R^2: coeficiente de correlación.

$\overline{E}$ promedio de la eficiencia de la qPCR para cada marcador, cada ensayo ha sido repetido 3 veces.

11.3 | Límite de detección (LOD)

Para estudiar el límite de detección del kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I se ha evaluado el rendimiento del ensayo de qPCR para cada marcador variando la concentración de ADNg de partida. Para ello, se selección una muestra de referencia heterocigota para el biomarcador analizado y se utinlizaron cantidades decrecientes de ADNg, entre las que se incluye la cantidad óptima recomendada para el ensayo (50 ng, 5 ng y 1 ng). Se hicieron tres réplicas de cada concentración y se evaluaron en los equipos compatibles especificados en el apartado 10 de este manual (Limitaciones).

En todos los casos y concentraciones testadas se cumple el criterio de coeficiente de variación (CV) establecido (CV < 25%). El límite de detección fijado es de 1 ng total de ADN genómico.

11.4 | Repetibilidad y reproducibilidad

La reproducibilidad y repetibilidad del kit Imegen® Quimera Screening Multiplex I se han evaluado, analizando 11 veces el 0.1% de cada marcador en las condiciones de ensayo recomendadas. Los ensayos se han validado por operadores independientes en los equipos compatibles con un total de 33 mediciones. Los ensayos se consideran repetibles y reproducibles con un coeficiente de variación inferior al 25%.

Contacte con nuestro Departamento Técnico para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos:

tech.support@healthincode.com

+34 963 212 340

healthincode