



Instrucciones de uso

Imegen[®] Quimera qPCR

Ref. IMG-116



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

Code: 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 cumplan 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. Los kits **Imegen® Quimera qPCR** han 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 06	AGO 2023	Se renombra la enzima en los apartados 6 y 7.
Versión 05	ABR 2023	Revisión de la Tabla 1
Versión 04	MAR 2023	Incorporación del apartado 11. Características de rendimiento.
Versión 03	NOV 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	Edición de formato

índice

01	Información General	4
02	Uso previsto	6
03	Características técnicas	8
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	12
	07.1 Preparación de los reactivos	12
	07.2 Preparación de las reacciones de amplificación	12
	07.3 Configuración del programa de la PCR a tiempo real	13
08	Análisis de los resultados	15
09	Troubleshooting	17
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 cuantificación	22
	11.4 Repetibilidad y reproducibilidad	22

01 Información general

El análisis de quimerismos moleculares resultantes de un trasplante alogénico de células hematopoyéticas 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). Como resultado 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 AI. 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.
- > Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9): e45. Doi:10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886, PMCID: PMC55695.
- > 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 quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009 Apr; 55(4):611-22. Doi: 10.1373/clinchem.2008.112797. Epub 2009 Feb 26. PMID 19246619.

➔ Procedimiento de análisis de quimerismos hematopoyéticos:

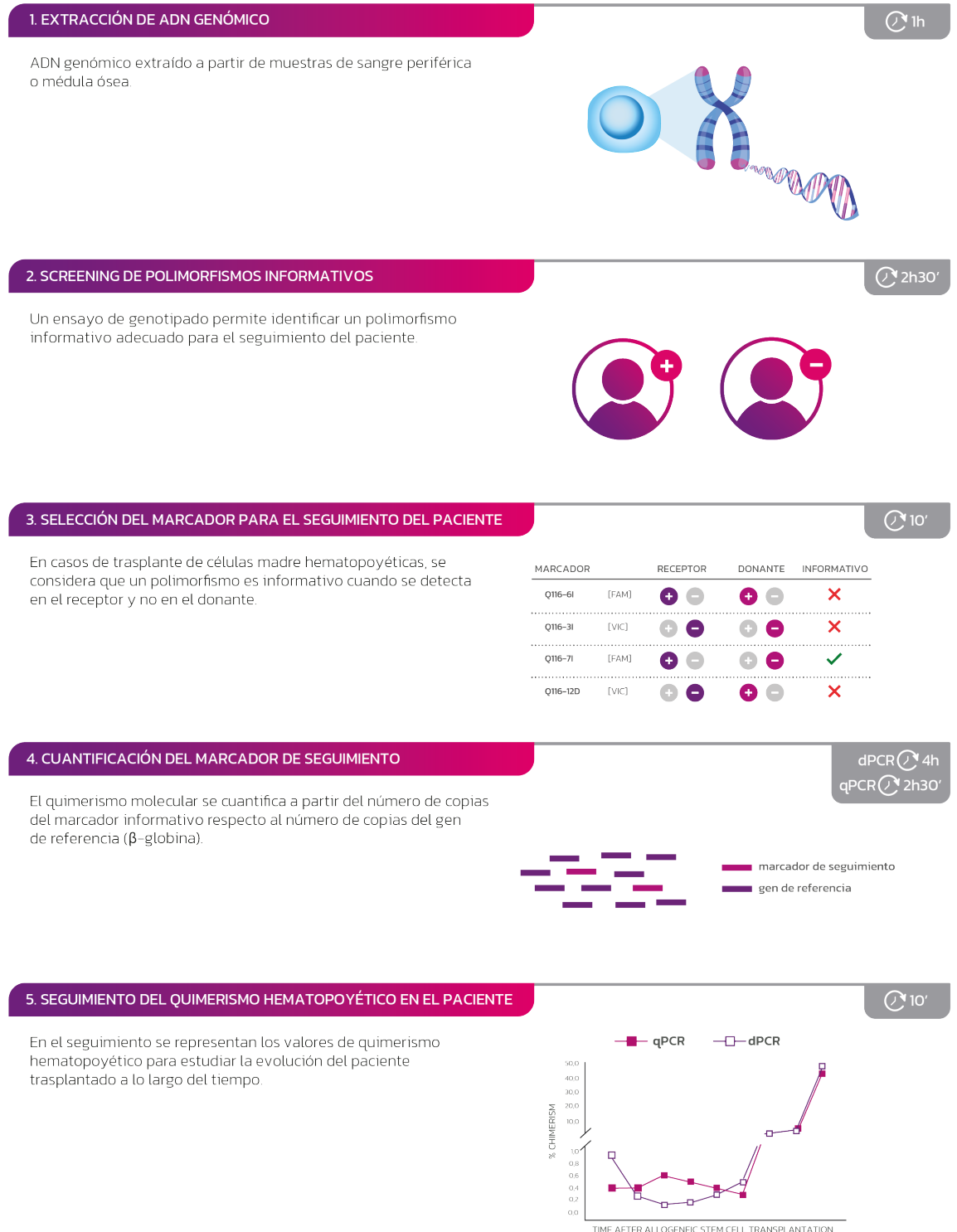


Figura 1. Procedimiento de análisis de quimerismos hematopoyéticos

02 Uso previsto

El kit **Imegen®-Quimera** para qPCR permite determinar la presencia de quimerismos hematopoyéticos en el periodo post-trasplante mediante cuantificación relativa de un marcador molecular por PCR a tiempo real. Este ensayo, está basado en el cribado previo de polimorfismos informativos, incluyendo INDELS (inserción/delección) y alelos nulos, los cuales son utilizados para cuantificar el quimerismo molecular como la cantidad relativa del marcador informativo respecto a la cantidad total de ADN genómico presente en la muestra. Para realizar dicha cuantificación es necesario analizar un gen de referencia (β -globina), que a su vez actuará como control positivo de amplificación, y un polimorfismo informativo.

Por tanto, en cada caso de trasplante, es fundamental seleccionar, en primer lugar, los polimorfismos informativos. Para ello, Health in Code S.L., ha validado las referencias **Imegen®-Quimera Screening Multiplex I** (IMG-116-24) e **Imegen®-Quimera Screening Multiplex II** (IMG-116-74). En caso de trasplante de médula ósea, se considera que un polimorfismo es informativo cuando se detecta en el receptor del trasplante y no en el donante.

Una vez seleccionado un marcador informativo, este puede ser empleado para llevar a cabo el seguimiento del paciente trasplantado. Para ello se han desarrollado un total de 34 marcadores incluyendo INDELS y alelos nulos, recogidos en la siguiente tabla:

Marcadores	Inserción (Alelo +)	Delección (Alelo -)	Referencia
SRY	X		IMG-116-2
Q116-3I	X		IMG-116-3
Q116-4I	X		IMG-116-4
Q116-5I	X		IMG-116-5
Q116-6I	X		IMG-116-6
Q116-7I	X		IMG-116-7
Q116-8I	X		IMG-116-8
Q116-9I	X		IMG-116-9
Q116-10I	X		IMG-116-10
Q116-11I	X		IMG-116-11
Q116-12I	X		IMG-116-12
Q116-32I	X		IMG-116-82
Q116-20I	X		IMG-116-20
Q116-23I	X		IMG-116-23
Q116-33I	X		IMG-116-16
Q116-37I	X		IMG-116-75

Marcadores	Inserción (Alelo +)	Delección (Alelo -)	Referencia
Q116-38I	X		IMG-116-76
Q116-44I	X		IMG-116-77
Q116-43I	X		IMG-116-78
Q116-49I	X		IMG-116-79
Q116-39I	X		IMG-116-80
Q116-50I	X		IMG-116-70
Q116-46I	X		IMG-116-66
Q116-47I	X		IMG-116-81
Q116-31I	X		IMG-116-83
Q116-24I	X		IMG-116-87
Q116-30D		X	IMG-116-84
Q116-29D		X	IMG-116-73
Q116-27D		X	IMG-116-88
Q116-12D		X	IMG-116-21
Q116-4D		X	IMG-116-13
Q116-5D		X	IMG-116-14
Q116-10D		X	IMG-116-17
RhD		X	IMG-116-18

Tabla 1. Referencias del kit Imegen®-Quimera para PCR a tiempo real.

Estas instrucciones de uso son adecuadas para el análisis de cualquiera de los 34 marcadores incluidos en la Tabla 1, ya que funcionan óptimamente bajo las mismas condiciones de PCR. Así pues, esta técnica posibilita un análisis rápido y efectivo de múltiples polimorfismos simultáneamente.

Los kits Imegen®-Quimera son sólo para uso en diagnóstico *in vitro* y están dirigidos a profesionales del sector de la biología molecular.

03 Características técnicas

Imegen®-Quimera consiste en un ensayo de PCR a tiempo real que permite llevar a cabo la cuantificación del número de copias de un marcador informativo para el seguimiento de quimerismo hematopoyético. Este kit emplea una combinación de cebadores específicos y sondas de hidrólisis fluorescentes para cuantificar la cantidad relativa de un marcador informativo en relación con la cantidad del gen de referencia, β -globina.

El análisis cuantitativo del quimerismo implementa un sistema de cálculo relativo ejecutando el método establecido por Pfaffl (2001) que tiene en consideración la eficiencia del sistema de amplificación y los valores de "*cycle threshold*" (Ct) obtenidos para un control endógeno o calibrador, incluida en el kit como un control positivo. A partir de estos valores, el sistema permite realizar el cálculo de quimerismo en cada ensayo. Así mismo, Health in Code S.L., ha desarrollado una herramienta de cálculo para facilitar el análisis de quimerismo mediante PCR a tiempo real.

El tipo de muestra empleada en la validación de estos kits **Imegen®-Quimera** para qPCR, es ADN genómico extraído de muestras de sangre periférica o de médula ósea provenientes de pacientes sometidos a un trasplante alogénico de células madre. El límite de cuantificación (LOQ) se ha establecido en 0.1%, mientras que el límite de detección (LOD) se ha establecido en 0.01% cuando se analizan muestras de ADN genómico.

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 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 microorganismos 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 los reactivos liofilizados necesarios para llevar a cabo 25 reacciones de PCR a tiempo real:

- **Polimorfismo *Master Mix***: Oligonucleótidos y sonda necesarios para la amplificación del marcador objeto de análisis (polimorfismo). La sonda para la detección del marcador está marcada con FAM™.
- **β-globin *Master Mix***: Oligonucleótidos y sonda necesarios para la amplificación del gen de referencia (β-globina). La sonda para la detección del gen de referencia está marcada con FAM™.
- ***Positive control***: es un estándar que actúa como calibrador y que permite la cuantificación relativa de los marcadores, así como el control de la evolución del trasplante, sin necesidad de tener que disponer y almacenar una gran cantidad de muestra del receptor antes del trasplante. Este estándar es un plásmido sintético que contiene cada polimorfismo en homocigosis, aportando información sobre si el polimorfismo se encuentra en la muestra en homocigosis (resultado=porcentaje esperado) o en heterocigosis (resultado=mitad del porcentaje esperado).

Reactivos	Cantidad	Conservación
<i>Polymorphism Master Mix</i>	25 rxn	4°C
<i>β-globin Master Mix</i>	25 rxn	4°C
<i>Positive control</i>	25 rxn	4°C

Tabla 2. Componentes del kit Imegen®-Quimera para PCR a tiempo real.

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real
- Micropipetas (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- *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 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Guantes de látex sin polvo

Kits complementarios

El paso previo a la cuantificación de un marcador informativo consiste en determinar por PCR a tiempo real la informatividad de los posibles polimorfismos. Para ello, Health in Code S.L., ha desarrollado los kits **Imegen® Quimera Screening Multiplex I** (Ref. IMG-116-24) e **Imegen® Quimera Screening Multiplex II** (Ref. IMG-116-74).

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de los reactivos

El reactivo incluido en este kit está liofilizado. El primer paso antes de aplicar el protocolo es rehidratar los reactivos con agua libre de nucleasas (Tabla 3). Para facilitar su resuspensión, 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.

Reactivos	Rehidratación
<i>Polymorphism Master Mix</i>	80 µL de agua/vial*
<i>β-globin Master Mix</i>	80 µL de agua/vial*
<i>Positive control</i>	100 µL de agua/vial*

Tabla 3. Volumen de agua libre de nucleasas para rehidratar los componentes del kit

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

07.2 | Preparación de las reacciones de amplificación

El ensayo deberá incluir las siguientes reacciones:

- ◇ Reacciones de cada muestra por duplicado.
- ◇ Reacciones del control positivo por duplicado.
- ◇ Reacción empleando el control negativo (reacción que contiene agua en lugar de ADN para garantizar la ausencia de contaminación en el proceso).

La cuantificación relativa con los kits de la serie **Imegen®-Quimera** para qPCR requiere la preparación de dos mixes diferentes de PCR: uno para analizar el gen de referencia (β -globina) y otro para analizar el polimorfismo informativo.

A continuación, se detalla el protocolo a seguir para preparar las reacciones de amplificación:

01 Descongelar los reactivos necesarios para el análisis, incluyendo:

- ◇ Muestras de ADN genómico diluidas a la concentración óptima (100 ng/µL).
- ◇ *Master Mix* del polimorfismo (rehidratado).
- ◇ *Master Mix* β -globina (rehidratado).
- ◇ Agua libre de nucleasas para los controles de PCR (CPCR)
- ◇ *Master Mix* de *PCR Hot Start (TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0*, ThermoFisher Scientific) (no suministrado).

- 02 Agitar en *vortex* y dar *spin* a los reactivos.
- 03 Preparar dos *mix* de PCR, añadiendo la cantidad señalada de cada reactivo en tubos de 1.5 mL, en función del número de reacciones totales. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo reactivos suficientes para analizar una reacción más, o bien añadir un 10% más de cada uno de los reactivos.

Reactivo	Cantidad por reacción
Polimorfismo <i>Master Mix</i>	3 μ L
<i>TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0</i>	5 μ L

Reactivo	Cantidad por reacción
β -Globina <i>Master Mix</i>	3 μ L
<i>TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0</i>	5 μ L

- 05 Agitar en *vortex* los *mix* de PCR y distribuir 8 μ L en los pocillos o tubos de PCR correspondientes.
- 06 Añadir 2 μ L de ADN de la muestra (100 ng/ μ L), del control positivo o de agua libre de nucleasas (control negativo) a los pocillos correspondientes.

↘ Muestras poco concentradas

En ocasiones, la primera recogida de muestra tras el trasplante da como resultado una concentración de AND genómico baja. En este caso, se recomienda preparar reacciones de amplificación con las siguientes cantidades de reactivos.

Reactivo	Cantidad por reacción
β -globin <i>Master Mix</i> or <i>polymorphism Master Mix</i>	5 μ L
<i>TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0</i>	7 μ L
DNA	10 μ L

Tabla 4. Cantidad de reactivo necesaria para muestras poco concentradas

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 deberán de seguir las siguientes instrucciones para configurar el programa de amplificación.

➤ 7500 Fast o StepOne Real-Time PCR system (ThermoFisher Scientific)

- ◇ Tipo de experimento: Quantitation- Standard curve
- ◇ Velocidad de rampa: standard
- ◇ Volumen de reacción: 10 μ L
- ◇ Referencia basal ROX™: incluida
- ◇ Fluoróforos de las sondas TaqMan®:

Sonda	Receptor	Emisor o <i>Quencher</i>
β -globina	FAM™	MGB
Polimorfismo informativo	FAM™	MGB

Tabla 5. Información de las sondas

◇ Programa óptimo:

Campos	Etapa 1 Activación enzimática	Etapa 2 PCR	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	50 ciclos	
		Desnaturalización	Unión de oligonucleótidos / Extensión
Temperatura	95°C	95°C	58°C
Tiempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto*

Tabla 6. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne

(*) 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	58°C	72°C	40°C
Tiempo	10 minutos	5 segundos	10 segundos	15 segundos*	20 segundos

Tabla 7. Programa de PCR óptimo para LightCycler® 480 Real-Time PCR system.

(*) Detección de la fluorescencia

08 Análisis de los resultados

Para un análisis correcto de los resultados se deberán de seguir las siguientes indicaciones:

- Comprobar que en los controles negativos no hay amplificación. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el análisis para descartar que se haya producido una contaminación accidental.
- Comprobar que, tanto en el estándar como en las muestras, el gen de referencia (β -globina) se detecta en un ciclo de PCR inferior a 26. Amplificaciones superiores a este Ct indican que la cantidad de ADN en la muestra no es suficiente, lo que producirá una disminución de la sensibilidad del análisis realizado.
- Para realizar la cuantificación relativa de la quimera hematopoyética, Health in Code S.L., pone a disposición una hoja de cálculo que puede descargarse en el siguiente enlace: <https://healthincode.com/quimera/quimera.xls>.
- Una vez descargada, deberá introducir los siguientes parámetros para obtener la cuantificación relativa y la interpretación del resultado:
 - ◇ Seleccionar el polimorfismo empleado en el análisis.
 - ◇ Indicar los Ct del estándar o calibrador, tanto para la β -globina como para el polimorfismo informativo analizado.
 - ◇ Indicar los Ct de las muestras, tanto para la β -globina como para el polimorfismo empleado.
- En caso de querer realizar los cálculos manualmente, la fórmula utilizada es la establecida por Pfaffl MW (2001):

$$\% \text{ Quimera} = \frac{(E_{\text{diana}})^{Ct \text{ diana (calibr.-muestra)}}}{(E_{\text{ref}})^{Ct \text{ ref (calibr.-muestra)}}} \times 100$$

E = Eficiencia de la reacción

Diana = Polimorfismo informativo analizado

Referencia = β -globina

↳ 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 podrá visualizar todas las acciones médicas y la evolución del paciente sobre un gráfico, además de exportar los resultados.

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

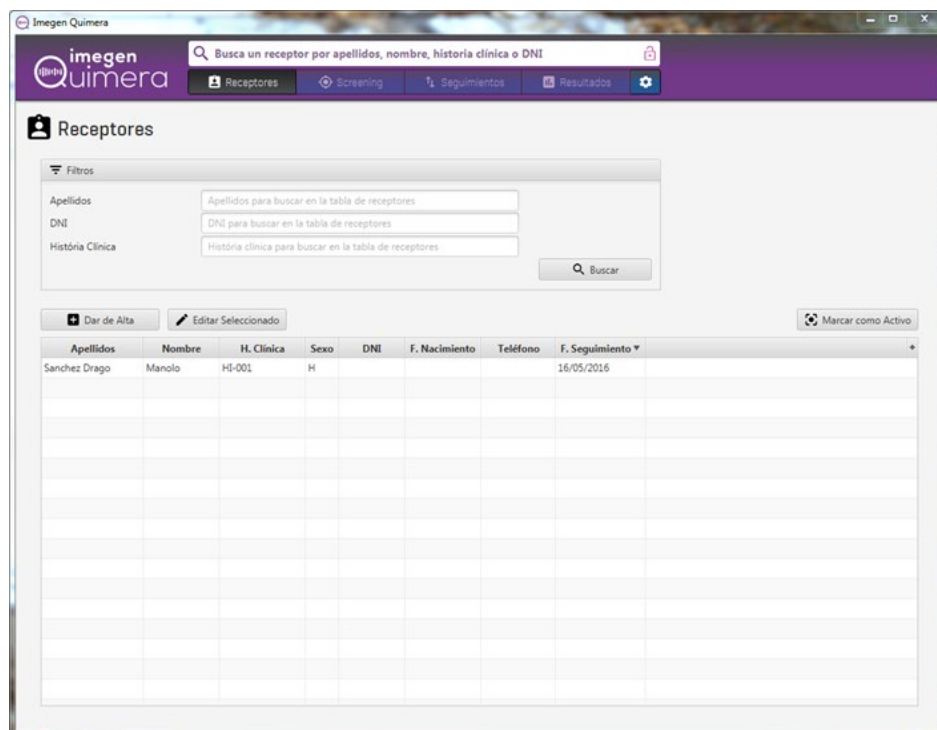


Figura 2. Vista de la aplicación de seguimiento de pacientes desarrollada por Health in Code S.L.

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

09 Troubleshooting

La tabla 8, presenta gráficamente los resultados que pueden obtenerse del análisis de los diferentes controles y de una muestra en un ensayo, así como su interpretación:

Control	Polimorfismo	β -Globina	Causa
Muestra de ADN	+	+	Resultado esperado
	-	+	Resultado esperado si se está analizando un marcador informativo
	-	-	Fallo de amplificación de la muestra ¹
Control positivo	+	+	Resultado esperado
	-	-	Fallo en la configuración de la PCR ²
Muestra de ADN	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación con ADN humano ³

Tabla 8. Interpretación de los posibles resultados obtenidos con Imegen[®]-Quimera

(1) **Fallo de amplificación de la muestra:** Compruebe que la concentración o calidad de ADN en la muestra es la adecuada; si fuese así, el resultado especificado puede deberse a que la muestra se encuentre altamente degradada. En esta situación, se recomienda un segundo análisis y extracción de ADN.

(2) **Fallo en la configuración de la PCR:** Un error en la amplificación puede deberse a un problema técnico durante la configuración de la PCR. Verifique el programa de amplificación y la configuración de la detección de fluorescencia.

(3) **Contaminación de la qPCR con ADN de humano:** La contaminación de la PCR puede deberse a un manejo equivocado de la muestra, al uso de reactivos contaminados o a contaminación de origen ambiental. Se recomienda limpiar minuciosamente el laboratorio donde se ha preparado la PCR, así como los equipos y el material utilizados. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR.

Otros problemas que pueden aparecer son:

+ Las curvas de amplificación resultantes no están normalizadas con ROX:

Comprobar que el fluorocromo ROX ha sido configurado como referencia pasiva, para normalizar pocillo a pocillo las variaciones resultantes del pipeteo o del equipo.

+ Poca reproducibilidad entre réplicas:

↘ Errores de pipeteo

Solución propuesta: Evitar las variaciones entre pipeteos empleando guantes, puntas con filtro y pipetas debidamente calibradas.

↘ Variaciones debidas a los másters de PCR

Solución propuesta: Preparar la cantidad suficiente de máster de PCR para preparar todas las reacciones pertinentes y asegurarse de que el máster está bien homogeneizado antes de su uso (se recomienda emplear vórtex).

↘ Concentración del ADN diana cercana al límite de detección: La reproducibilidad entre réplicas se puede ver comprometida si el ADN diana se encuentra a una concentración cercana al límite de detección.

+ Intensidad de la señal baja o no detectada:

↘ Uno o más de los componentes no ha sido añadido a la reacción o no está a la concentración apropiada.

Solución propuesta: Preparar los master mixes de nuevo y repetir el ensayo si es necesario.

↘ Fallo en la lectura de fluorescencia

Solución propuesta: Comprobar que la señal de fluorescencia ha sido capturada en el paso y canal apropiados. Confirmar que las sondas han sido configuradas en el programa de amplificación, asociadas al fluorocromo correcto, y que los niveles de ROX/fluoresceína sean correctos.

↘ Presencia de inhibidores

Solución propuesta: En ocasiones, inhibidores procedentes del proceso de extracción dificultan o imposibilitan la reacción de amplificación. Si esto ocurre, se puede purificar o diluir el ADN para eliminar o minimizar la presencia de inhibidores en la reacción.

↘ Condiciones de PCR subóptimas

Solución propuesta: Comprobar que las condiciones de amplificación son las apropiadas.

↘ Problemas con la "baseline" y/o el "threshold"

Solución propuesta: Establecer manualmente los valores de "baseline" y/o "threshold" para obtener valores precisos de Cp/Ct.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

Imegen[®]-Quimera para qPCR ha sido validado usando las siguientes plataformas 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, contacte con el departamento técnico para cualquier consulta o aclaración.

10.2 | Reactivos

Imegen[®]-Quimera para qPCR 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, como se indica en el apartado 6 de este manual (Equipos y materiales necesarios que no se suministran). En caso de duda, por favor contacte 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 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** para qPCR está diseñado para el análisis de ADN genómico (ADNg) total extraído a partir de muestras de sangre periférica o médula ósea.

Los ensayos de cuantificación **Imegen®-Quimera** para qPCR han sido validados con 7 muestras de ADN sintético (plásmido) y 48 muestras de ADNg cuyo genotipo ha sido previamente analizado para identificar la presencia/ausencia de los marcadores INDEL y alelos nulos que componen el kit.

11.2 | Linealidad y eficiencia

El grado de linealidad y eficiencia de **Imegen®-Quimera** para qPCR se ha establecido 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 (Tabla 9) confirman una adecuada eficiencia y linealidad ($R^2 > 0,99$) para la cuantificación de los marcadores utilizados en el kit **Imegen®-Quimera** para qPCR. Estos parámetros han sido validados de acuerdo con las guías MIQE, *minimum information for publication of quantitative real-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 (\bar{E}) de cada marcador se calcula mediante la siguiente fórmula:

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

Nombre marcador	Parámetros					
	Marcador			β-Globina		
	Pendiente	R ²	\bar{E}	Pendiente	R ²	\bar{E}
Q116-8I	-3,25	0,99	2,04	-3,32	0,99	2,00
Q116-6I	-3,35	0,99	1,99	-3,32	0,99	2,00
Q116-11I	-3,51	0,99	1,93	-3,32	0,99	2,00
Q116-4I	-3,25	0,99	2,04	-3,32	0,99	2,00
Q116-5I	-3,15	0,99	2,08	-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	1,99	-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	1,92	-3,21	0,99	2,05
Q116-4D	-3,60	0,99	1,90	-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	1,99	-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	2,03	-3,21	0,99	2,05
Q116-10D	-3,31	0,99	2,01	-3,48	0,99	1,94
SRV	-3,35	0,99	1,99	-3,48	0,99	1,94
RhD	-3,46	0,99	1,95	-3,48	0,99	1,94
Q116-27D	-3,20	0,99	2,04	-3,30	0,99	2,04
Q116-29D	-3,31	0,98	2,01	-3,30	0,99	2,04
Q116-30D	-3,24	0,99	2,06	-3,30	0,99	2,04
Q116-24I	-3,37	0,99	1,98	-3,30	0,99	2,04
Q116-33I	-3,23	0,99	2,04	-3,33	0,99	1,94
Q116-50I	-3,27	0,99	2,02	-3,33	0,99	1,94
Q116-46I	-3,35	0,99	1,99	-3,33	0,99	1,94
Q116-37I	-3,42	0,99	1,96	-3,32	0,99	2,00
Q116-38I	-3,44	0,99	1,95	-3,32	0,99	2,00
Q116-39I	-3,41	0,99	1,97	-3,32	0,99	2,00
Q116-43I	-3,44	0,99	1,95	-3,32	0,99	2,00
Q116-47I	-3,43	0,99	1,96	-3,32	0,99	2,00
Q116-44I	-3,35	0,99	1,99	-3,32	0,99	2,00
Q116-49I	-3,32	0,99	2,00	-3,32	0,99	2,00
Q116-32I	-3,29	0,99	2,01	-3,32	0,99	2,00
Q116-31I	-3,40	0,99	1,97	-3,32	0,99	2,00

Tabla 9. Resultados de los parámetros de linealidad y eficiencia obtenidos con los calibradores sintéticos para cada sistema de qPCR. R²: coeficiente de correlación.

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

11.3 | Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación de los kits **Imegen®-Quimera** para qPCR se evaluó mediante la preparación de ensayos alelo-específicos para cada uno de los marcadores de interés. Para ello, se llevaron a cabo mezclas de ADN de muestras positivas en ADN de muestras negativas hasta alcanzar diluciones del 0,1%. Cada marcador fue analizado un total de 33 veces obteniendo un coeficiente de variación (CV) < 25% para cada uno de ellos, por lo que se pudo establecer el LOQ al 0,1%.

11.4 | Reproducibilidad y repetibilidad

La repetibilidad y reproducibilidad de los kits **Imegen®-Quimera** para qPCR se han evaluado analizando 11 veces el LOD de cada marcador con operadores independientes en dos equipos de PCR a tiempo real en días diferentes (33 mediciones en total). Los ensayos se consideran repetibles y reproducibles con un CV 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



Conoce todos nuestros
kits de diagnóstico

