



Instrucciones de uso

Imegen[®] Quimera Screening Multiplex Plus II

CE IVD

Ref. IMG-116-25

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.03

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.

Este producto está diseñado 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 Plus II** para dPCR ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro 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 08 | DIC 2023 | Revisión y actualización del contenido. |
| Versión 07 | JUL 2023 | Se renombra la enzima en los apartados 06, 07.1 y 10.2. Se clarifica el uso de los marcadores RhD y SRY en los apartados 02 y 03. Modificación de la tabla 8 en el apartado 09 "Troubleshooting". Se incorpora el apartado 11 "Características de rendimiento". |
| Versión 06 | 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 05 | MAY 2022 | Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a Health in Code S.L. |
| Versión 04 | NOV 2021 | Actualización de la sección Troubleshooting |
| Versión 03 | OCT 2018 | Especificación en apartado 3 de la cantidad de ADN necesaria para llevar a cabo el análisis. |

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, carga y lectura | 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 | Limitaciones | 20 |
| 11.1 | Muestras de validación | 20 |
| 11.2 | Sensibilidad y especificidad analítica | 20 |
| 11.3 | Límite de detección (LOD) | 21 |
| 11.4 | Repetibilidad y reproducibilidad | 22 |

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. Tal aproximación es de gran utilidad no sólo para determinar el riesgo de recaída, rechazo o enfermedad de injerto contra huésped, sino también para evaluar la respuesta a diferentes modalidades de tratamiento.

Toda la familia de kits **Imegen®-Quimera** ha sido desarrollada en colaboración con el Hospital Regional Carlos Haya 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

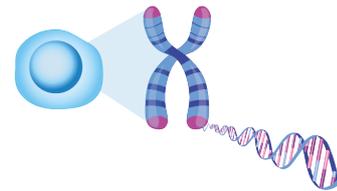
- > Jiménez-Velasco A, Barrios M, Román-Gómez J, Navarro G, Buño I, Castillejo J, et al. *Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. Leukemia. 2005 Mar;19(3):336-43. doi: 10.1038/sj.leu.2403622. PMID: 15674363.*
- > Stahl T, Böhm M, Kröger N, Fehse B. *Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. Experimental Hematology. 2015 Jun;43(6):462-8.e1. doi: 10.1016/j.exphem.2015.02.006. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25795523.*

➔ 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] | + | - | + | - | X |
| Q116-3I | [VIC] | + | - | + | - | X |
| Q116-7I | [FAM] | + | - | + | - | ✓ |
| Q116-12D | [VIC] | + | - | + | - | X |

4. CUANTIFICACIÓN DEL MARCADOR DE SEGUIMIENTO

dPCR 4h
qPCR 2h30'

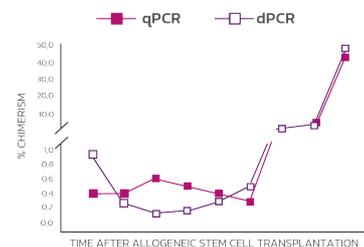
El quimerismo molecular se cuantifica a partir del número de copias del marcador informativo respecto al número de copias del gen de referencia (β -globina).



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.



02 Uso previsto

El kit **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II** permite la selección de marcadores informativos para el seguimiento de pacientes con trasplante de médula ósea mediante el análisis simultáneo de 16 polimorfismos de inserción/delección (INDELS) en 8 reacciones independientes por PCR multiplex a tiempo real.

Para determinar la informatividad de los polimorfismos se han desarrollado los kits **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus** (IMG-116-26) e **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II** (IMG-116-25). En casos de trasplante de células hematopoyéticas, se considera que un polimorfismo es informativo cuando se detecta en el receptor del trasplante y no en el donante, mientras que, en estudios de órgano sólido, un marcador sería considerado informativo si se detectase en el donante y no en el receptor. En la Tabla 1 se agrupan los marcadores incluidos en ambos kits.

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

03 Características técnicas

El kit **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II** consiste en un ensayo de genotipado de 16 biomarcadores, incluyendo alelos nulos e INDELs (inserción-delección) que permite identificar marcadores informativos para el análisis de quimerismos hematopoyéticos (Tabla 1).

El kit **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II** incluye el marcador RhD para los casos en los que no se dispone de la información del Rh del receptor y del donante. Este marcador se considera informativo cuando el receptor tiene grupo sanguíneo Rh+ y el donante Rh-. El marcador SRY, presente en el Chr Y, no está incluido en los kits de **Imegen® Quimera Screening** ya que no es necesario hacer un análisis molecular previo a su cuantificación, siendo el marcador SRY informativo cuando el receptor es varón y la donante es mujer. El análisis del SRY está disponible para la cuantificación y seguimiento con el kit **Imegen® Quimera dPCR Dry**

Junto con **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus** y el marcador SRY, los kits **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus** e **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II** incluyen un total de 33 marcadores (Figura 1 y Tabla 1).

33 marcadores en 18 cromosomas

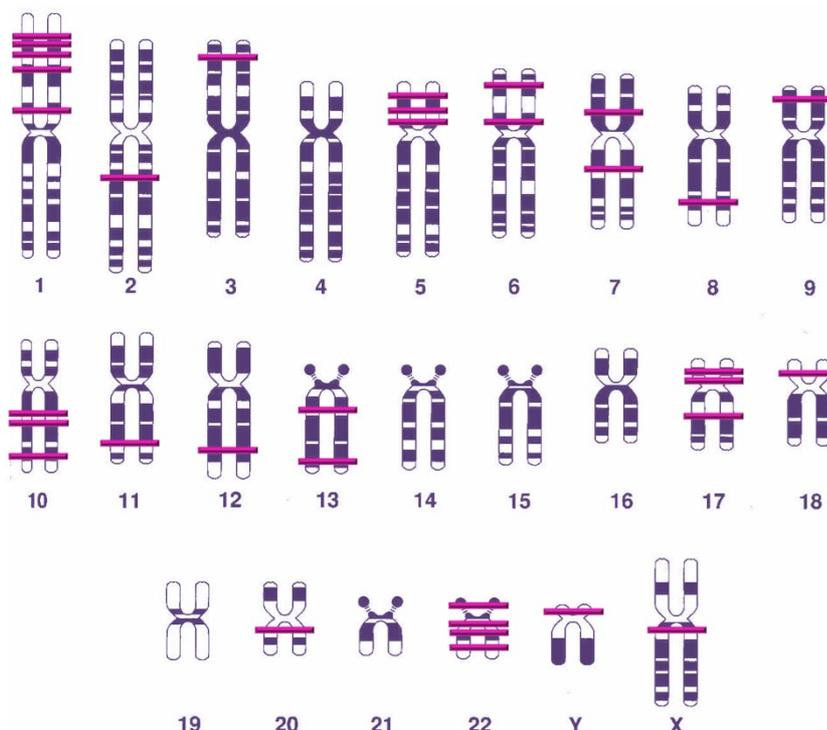


Figura 1. Representación cromosómica de los biomarcadores incluidos en los ensayos de genotipado y seguimiento de quimerismos.

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

IMG-116-26 Screening Multiplex Plus

| 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 |
| 28I | 12q24.23 |
| 32I | 3p25.3 |
| 31I | 6p21.2 |
| 29D | 17q21.31 |
| 30D | 7q21.3 |
| 27D | 18p11.22 |
| 24I | 1p34.1 |

IMG-116-25 Screening Multiplex Plus 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 |
| 45I | 15q21.3 |
| 9I | 22q11.22 |
| 41I | 10q23.33 |
| 20I | 8q24.22 |
| 46I | 9p23 |
| 47I | 11q23.2 |
| 42I | 11q22.3 |
| RhD | 1p36.11 |

Tabla 1. Posición cromosómica de los biomarcadores. El marcador SRY, localizado en Chr Y, está también disponible para el seguimiento.

El funcionamiento clínico de este kit ha sido validado empleando ADN genómico extraído a partir de sangre periférica o médula ósea de muestras humanas. El límite de detección se ha establecido en 0.01% cuando se utilizan muestras de ADN genómico.

La informatividad global acumulada de este panel, junto con el marcador SRY, es del 99.1%. En caso de analizar también el panel Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus, la informatividad global acumulada sería del 99.98%.

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 a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
- ◇ 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 del 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.

| Tubo | Reacciones | Marcadores | Conservación | Rehidratación* |
|------|---------------|----------------------|--------------|--------------------|
| 1 | 10 reacciones | Q116-33I Q116-37I | 4°C | 33 µL de agua/vial |
| 2 | 10 reacciones | Q116-38I Q116-44I | 4°C | 33 µL de agua/vial |
| 3 | 10 reacciones | Q116-43I Q116-49I | 4°C | 33 µL de agua/vial |
| 4 | 10 reacciones | Q116-39I Q116-50I | 4°C | 33 µL de agua/vial |
| 5 | 10 reacciones | Q116-9I Q116-45I | 4°C | 33 µL de agua/vial |
| 6 | 10 reacciones | Q116-20I Q116-41I | 4°C | 33 µL de agua/vial |
| 7 | 10 reacciones | Q116-46I Q116-47I | 4°C | 33 µL de agua/vial |
| 8 | 10 reacciones | RhD Q116-42I | 4°C | 33 µL de agua/vial |

Tabla 2. Componentes del kit Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II 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

En caso de que el kit **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II** no identificase ningún marcador informativo, se recomienda el uso del kit **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus** (REF: IMG-116-26), el cual ofrece 16 nuevos marcadores.

Una vez se ha identificado un polimorfismo como informativo, recomendamos adquirir el kit correspondiente de **Imegen® Quimera** para dPCR de nuestro catálogo, para llevar a cabo el seguimiento del paciente y, por tanto, el análisis del órgano trasplantado y la evaluación del riesgo de recaída. Los kits **Imegen® Quimera** permiten cuantificar de manera absoluta la cantidad de marcador informativo (quimerismo) o de manera relativa en relación a la cantidad total de ADN genómico, empleando un gen de referencia (β -globina). El gen de referencia se analiza simultáneamente con el marcador informativo en una reacción multiplexada, además sirve como control de la calidad y cantidad de la muestra de ADN analizada.

| Nombre del kit | Referencia |
|--------------------------------|------------|
| Imegen® Quimera SRY dPCR | IMG-116-27 |
| Imegen® Quimera RhD dPCR | IMG-116-28 |
| Imegen® Quimera Q116-3I dPCR | IMG-116-29 |
| Imegen® Quimera Q116-4I dPCR | IMG-116-30 |
| Imegen® Quimera Q116-5I dPCR | IMG-116-31 |
| Imegen® Quimera Q116-6I dPCR | IMG-116-32 |
| Imegen® Quimera Q116-7I dPCR | IMG-116-33 |
| Imegen® Quimera Q116-11I dPCR | IMG-116-34 |
| Imegen® Quimera Q116-10I dPCR | IMG-116-35 |
| Imegen® Quimera Q116-12D dPCR | IMG-116-36 |
| Imegen® Quimera Q116-23I dPCR | IMG-116-37 |
| Imegen® Quimera Q116-24I dPCR | IMG-116-38 |
| Imegen® Quimera Q116-20I dPCR | IMG-116-40 |
| Imegen® Quimera Q116-27D dPCR | IMG-116-41 |
| Imegen® Quimera Q116-28I dPCR | IMG-116-42 |
| Imegen® Quimera Q116-29D dPCR | IMG-116-43 |
| Imegen® Quimera Q116-30D dPCR | IMG-116-44 |
| Imegen® Quimera Q116-31I dPCR | IMG-116-45 |
| Imegen® Quimera Q116-32I dPCR | IMG-116-46 |
| Imegen® Quimera Q116-33I dPCR | IMG-116-47 |
| Imegen® Quimera Q116-9I dPCR | IMG-116-48 |
| Imegen® Quimera Q116-37I dPCR | IMG-116-49 |
| Imegen® Quimera Q116-38I dPCR | IMG-116-50 |
| Imegen® Quimera Q116-39I dPCR | IMG-116-51 |
| Imegen® Quimera Q116-41I dPCR | IMG-116-52 |
| Imegen® Quimera Q116-42I dPCR | IMG-116-53 |
| Imegen® Quimera Q116-43I dPCR | IMG-116-54 |
| Imegen® Quimera Q116-44I dPCR | IMG-116-55 |
| Imegen® Quimera Q116-45I dPCR | IMG-116-56 |
| Imegen® Quimera Q116-47II dPCR | IMG-116-57 |
| Imegen® Quimera Q116-49I dPCR | IMG-116-58 |
| Imegen® Quimera Q116-50I dPCR | IMG-116-59 |
| Imegen® Quimera Q116-46II dPCR | IMG-116-60 |

Tabla 3. Kits Imegen® Quimera dPCR para seguimiento por PCR digital

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de los reactivos

Todos los reactivos incluidos en el kit están liofilizados. El primer paso antes de utilizar cualquiera de nuestros kits consistirá en rehidratar los reactivos añadiendo 33 μL de agua libre de nucleasas/vial*. Con el objetivo de 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 estos 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.

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

- + **Master Mix del Screening Multiplex**
- + **Master Mix de PCR Hot Start (TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0, ThermoFisher Scientific) (no suministrado)**

El protocolo recomendado para preparar las reacciones de amplificación es el siguiente:

- 01 Descongelar la tira de 8 tubos que contiene los Masters de *Screening* y el ADN del receptor y del donante. Agitar con *vortex* cada uno de los reactivos y mantener en frío.
- 02 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.
- 03 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.
- 04 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.
- 05 Añadir 3 μL de cada *Máster de Screening* tanto a los pocillos con ADN del receptor como a los pocillos con el ADN del donante.

07.3 | Configuración del programa de la PCR, carga y lectura

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

| Tubo | Marcadores | Inserción (Alelo +) | Delección (Alelo -) | Marcaje | Emisor o Quencher |
|------|------------|---------------------|---------------------|---------|-------------------|
| 1 | Q116-33I | X | | FAM™ | MGB |
| | Q116-37I | X | | VIC™ | |
| 2 | Q116-38I | X | | FAM™ | |
| | Q116-44I | X | | VIC™ | |
| 3 | Q116-43I | X | | FAM™ | |
| | Q116-49I | X | | VIC™ | |
| 4 | Q116-39I | X | | FAM™ | |
| | Q116-50I | X | | VIC™ | |
| 5 | Q116-9I | X | | FAM™ | |
| | Q116-45I | X | | VIC™ | |
| 6 | Q116-20I | X | | FAM™ | |
| | Q116-41I | X | | VIC™ | |
| 7 | Q116-46I | X | | FAM™ | |
| | Q116-47I | X | | VIC™ | |
| 8 | RhD | X | | FAM™ | |
| | Q116-42I | X | | VIC™ | |

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

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

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

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

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

(*) Detección de la fluorescencia

➤ Lightcycler 480 (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

◇ Analisis: *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.

A continuación, se muestra una tabla con los posibles resultados:

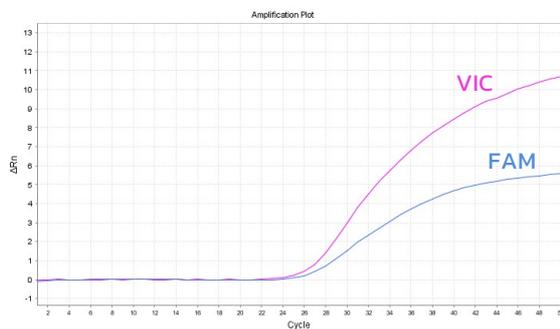
| Reactivos | Resultados | | Informatividad | |
|--------------|------------|---------|----------------|-----------------|
| | Receptor | Donante | Médula Ósea | Órganos sólidos |
| Polimorfismo | + | + | No informativo | No informativo |
| Polimorfismo | + | - | Informativo | No informativo |
| Polimorfismo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

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

En caso de no haber obtenido ningún marcador informativo, se recomienda contactar con el departamento técnico: tech.support@healthincode.com

A continuación, se muestra una figura en la que se ejemplifica el resultado de dos marcadores multiplexados. El marcador marcado con VIC sería informativo en caso de trasplante de médula ósea, pero no en trasplante de órgano sólido, tal y como se indica en la Tabla 7.

Receptor



Donante

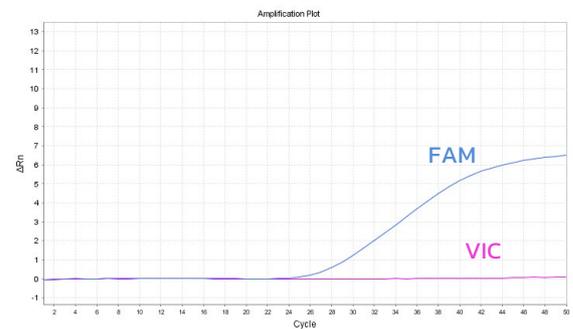


Figura 2. Resultados obtenidos en 7500 FAST Real-time PCR System para muestras de receptor y donante. Dos marcadores genéticos se multiplexan en cada reacción de PCR. Las curvas de amplificación azules representan la señal de amplificación en el canal FAM y las curvas de amplificación rosas representan la señal de amplificación en el canal VIC

09 Troubleshooting

La tabla que aparece a continuación presenta gráficamente los resultados que podrían obtenerse del análisis de los diferentes controles positivos y negativos y de una muestra de ADN genómico en un ensayo, así como su interpretación y la razón más probable que causa dicho resultado:

| Control | C _T Polimorfismo | 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

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. Limpie a fondo 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 por el protocolo. En ese caso, se recomienda cuantificar la muestra de nuevo mediante absorbancia o fluorescencia. Si es necesario, use nuevas alícuotas de los reactivos utilizados en la PCR y repita el ensayo.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II 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 Screening Multiplex Plus II ha sido validado utilizando la siguiente polimerasa *Hotstart*:

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

Se aconseja utilizar los reactivos de PCR recomendados por el fabricante del producto. 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 Screening Multiplex Plus II está diseñado para el análisis de ADN genómico (ADNg). Los sistemas de qPCR para cada marcador del kit se han puesto a punto con muestras de ADN sintético (plásmido).

Adicionalmente, se ha utilizado:

- ◇ una cohorte de 35 muestras reales y en la que hay al menos una muestra positiva para cada marcador. Las muestras positivas utilizadas en la validación provienen del Biobanco de Health in Code, S.L. y presentan el polimorfismo en homocigosis o heterocigosis.
- ◇ 26 muestras de referencia, obtenidas del *NIGMS Human Genetic Cell Repository* del Coriell Institute for Medical Research, que albergan alguno de los polimorfismo de interés.

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.

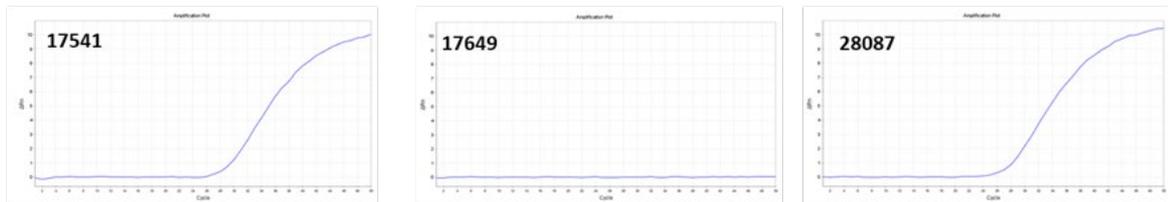
11.2 | Sensibilidad y especificidad analítica

Tras la puesta a punto de los sistemas con plásmidos específicos para cada marcador, se llevó a cabo la evaluación de la sensibilidad y especificidad analítica, para todos los marcadores, con las muestras reales y de referencia seleccionadas.

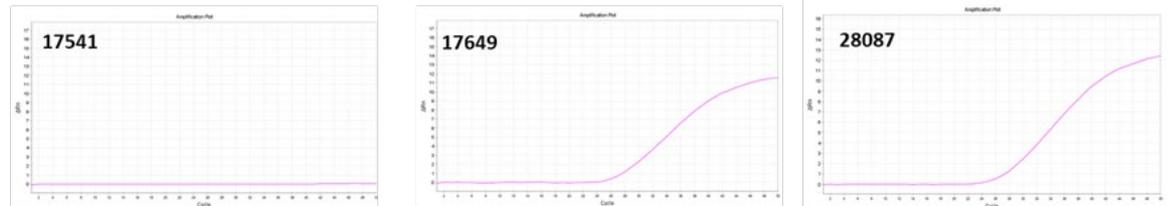
Inicialmente, se eligió una muestra positiva y negativa para cada marcador. Estas muestras se verifican primero con los sistemas diseñados sin multiplexar y, seguidamente, se multiplexan en parejas. En la Figura 4, se muestra un ejemplo de PCRs multiplexadas e individuales de los marcadores 39I/50I, donde se aprecia que no hay diferencias en la eficiencia de la PCR. Todos los sistemas multiplexados coincidieron con los resultados de los sistemas evaluados individualmente.

Finalmente, se ampliaron los estudios de sensibilidad y especificidad con el resto de las muestras reales y de referencia.

A) Marcador individual 39I



B) Marcador individual 50I



C) Marcadores multiplexados 39I/50I

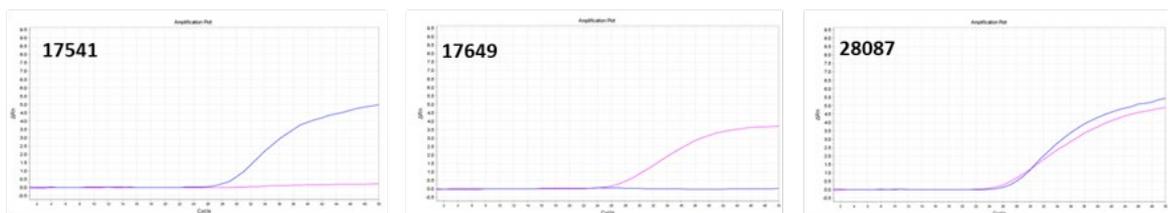


Figura 4. Resultados de la especificidad analítica para los marcadores 39I/50I por separado y en un sistema de PCR multiplexado.

Los resultados obtenidos determinan que:

- + los sistemas de PCR multiplexados muestran la misma eficiencia y especificidad que para los 16 marcados evaluados individualmente.
- + los sistemas identifican correctamente verdaderos positivos y verdaderos negativos, resultando en un 100% de sensibilidad y especificidad.

En todos los casos los sistemas diseñados han determinado correctamente el genotipo de las muestras.

11.3 | Límite de detección (LOD)

Para estudiar el LOD del kit **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II** se evaluó el rendimiento del ensayo de qPCR para cada marcador variando la concentración de ADN_g de partida. Para ello, se seleccionó una muestra de referencia heterocigota para el biomarcador analizado y se utilizaron cantidades decrecientes ADN_g, entre las que se incluye la cantidad óptima recomendada para el ensayo (50 ng, 5 ng y 1 ng). Las diluciones obtenidas se verificaron con el *DNAds Qubit™* (ThermoFisher Scientific). A continuación, se hicieron tres réplicas de cada concentración y se evaluaron en los equipos *7500 FAST* y *StepOne* (ThermoFisher Scientific).

En todos los casos y concentraciones testadas se cumple el criterio de coeficiente de variación establecido (CV < 25%). Por lo tanto, el límite de detección fijado es de 1 ng total de ADN genómico para muestras con los polimorfismos en hetero- o homocigosis.

11.4 | Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad del kit Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II se ha evaluado para todos los marcadores, analizando 3 réplicas de una muestra positiva para el marcador siendo evaluado, en un mismo ensayo, tanto con el sistema qPCR multiplexado como individual. A continuación, se calculó el CV entre réplicas de un mismo marcador que en todos los casos fue inferior al 25% (criterio de aceptación establecido).

Para evaluar la reproducibilidad de cada pareja de marcadores se realizaron tres ensayos en días diferentes por operadores diferentes para los dos equipos validados (*Applied Biosystems™ 7500 Fast* como en el *StepOnePlus™*) con las siguientes características:

- ENSAYO 1: se utiliza una muestra positiva para los dos marcadores.
- ENSAYO 2: se utiliza una muestra positiva para uno de los dos marcadores.
- ENSAYO 3: se utiliza una muestra positiva para uno de los dos marcadores.

En la Tabla 9 se recogen los resultados obtenidos para determinar la reproducibilidad del kit. Los resultados obtenidos permiten establecer una precisión adecuada para el kit Imegen® Quimeras Screening Multiplex Plus II al obtener un coeficiente de variación inferior al 25% entre replicas y una concordancia del 100% en los experimentos de reproducibilidad.

| Mix | Marcador | ENSAYO 1 | | ENSAYO 2 | | ENSAYO 3 | | Concordancia |
|-----|----------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|--------------|
| | | 7500 FAST | StepOne Plus | 7500 FAST | StepOne Plus | 7500 FAST | StepOne Plus | |
| 1 | Q116-33I | 22,55 | 24,02 | N.D. | N.D. | 23,67 | 24,67 | 100% |
| | Q116-37I | 24,66 | 25,48 | 24,13 | 24,89 | N.D. | N.D. | |
| 2 | Q116-38I | 24,42 | 25,66 | 25,03 | 25,2 | N.D. | N.D. | |
| | Q116-44I | 26,23 | 26,85 | N.D. | N.D. | 25,98 | 24,77 | |
| 3 | Q116-43I | 23,81 | 26,12 | 30,86 | 27,13 | N.D. | N.D. | |
| | Q116-49I | 22,08 | 21,13 | N.D. | N.D. | 25,79 | 27,66 | |
| 4 | Q116-39I | 30,62 | 30,1 | 26,6 | 26,27 | N.D. | N.D. | |
| | Q116-50I | 29,70 | 29,58 | N.D. | N.D. | 23,93 | 23,1 | |
| 5 | Q116-9I | 22,56 | 23,04 | 22,71 | 23,18 | N.D. | N.D. | |
| | Q116-45I | 25,66 | 26,55 | N.D. | N.D. | 25,02 | 26,12 | |
| 6 | Q116-20I | 22,00 | 22,51 | NA | NA | 23,10 | 23,45 | |
| | Q116-41I | 23,68 | 24,09 | * | * | N.D. | N.D. | |
| 7 | Q116-46I | 24,64 | 25,75 | N.D. | N.D. | 29,94 | 30,04 | |
| | Q116-47I | 24,87 | 25,84 | 24,62 | 25,48 | N.D. | N.D. | |
| 8 | Q116-RhD | 21,47 | 21,75 | 21,42 | 21,83 | NA | NA | |
| | Q116-42I | 23,71 | 23,90 | N.D. | N.D. | * | * | |

Tabla 9. Resultados prueba reproducibilidad.

N.D.: no detectado: los resultados N.D. corresponden a las muestras negativas para el marcador con Cts > 30 o "Indeterminado". (*) Las celdas con * indican que no se pudo obtener muestras que fueran únicamente positivas para el marcador de interés. NA: no aplica.

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

