



Instrucciones de uso

Imegen[®] Quimera dPCR (Dry)



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

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 sigan 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 dPCR Dry** 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 07 | DIC 2023 | Revisión y actualización del contenido. |
| Versión 06 | JUN 2023 | Cambio del nombre del kit a lo largo del documento (de Imegen® Quimera dPCR a Imegen® Quimera dPCR Dry). |
| | | Se renombra el reactivo "Polymorphism Master Mix" por "Marcador Master Mix". |
| Versión 05 | MAY 2022 | Modificación del apartado 7.1. Preparación de los reactivos. Se actualiza el volumen de rehidratación según el equipo utilizado. |
| | | Se añade el apartado "11. Características del rendimiento". |
| Versión 04 | FEB 2019 | 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 | 13 |
| | 07.1 Preparación de los reactivos | 13 |
| | 07.2 Preparación de las reacciones de amplificación | 13 |
| | 07.3 Configuración del programa de PCR, carga y lectura | 15 |
| 08 | Análisis de los resultados | 18 |
| 09 | Troubleshooting | 21 |
| 10 | Limitaciones | 22 |
| | 10.1 Equipos | 22 |
| | 10.2 Reactivos | 22 |
| | 10.3 Estabilidad del producto | 22 |
| 11 | Características de rendimiento | 23 |
| | 11.1 Muestras de validación | 23 |
| | 11.2 Linealidad y eficiencia | 23 |
| | 11.3 Límite de cuantificación | 23 |
| | 11.4 Repetibilidad y reproducibilidad | 24 |

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 Universitario Regional 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.

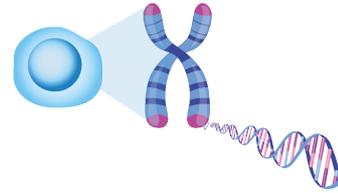
Referencias

- > 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 MU, 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] | + - | + - | ✗ |
| 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.

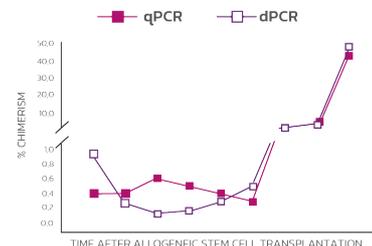


Figura 1. Procedimiento de análisis de quimerismos hematopoyéticos

02 Uso previsto

El kit **Imegen® Quimera dPCR Dry** está destinado a la monitorización del quimerismo en sangre periférica y/o médula ósea tras un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Este ensayo está basado en el cribado previo de polimorfismos/marcadores informativos, incluyendo INDELS (inserción/delección) y alelos nulos, los cuales son utilizados para cuantificar el quimerismo molecular como la cantidad absoluta del marcador informativo o la cantidad relativa del marcador informativo respecto a la cantidad total de ADN genómico presente en la muestra (PCR multiplex). Para realizar dicha cuantificación es necesario analizar un gen de referencia (β -globina), que a su vez actuará como control positivo de amplificación.

Por tanto, es fundamental seleccionar en primer lugar los polimorfismos informativos en cada caso de trasplante. Para ello, Health in Code S.L., ha validado dos referencias: **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus (IMG-116-26)** e **Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II (IMG-116-25)**. 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 33 INDELS, que se recogen en la Tabla 1.

| Marcadores | Inserción | Delección | Referencia del kit |
|------------|-----------|-----------|--------------------|
| SRY | X | | IMG-116-27 |
| RhD | X | | IMG-116-28 |
| Q116-6I | X | | IMG-116-32 |
| Q116-3I | X | | IMG-116-29 |
| Q116-7I | X | | IMG-116-33 |
| Q116-12D | | X | IMG-116-36 |
| Q116-11I | X | | IMG-116-34 |
| Q116-5I | X | | IMG-116-31 |
| Q116-4I | X | | IMG-116-30 |
| Q116-10I | X | | IMG-116-35 |
| Q116-23I | X | | IMG-116-37 |
| Q116-28I | X | | IMG-116-42 |
| Q116-32I | X | | IMG-116-46 |
| Q116-31I | X | | IMG-116-45 |
| Q116-30D | | X | IMG-116-44 |

| Marcadores | Inserción | Delección | Referencia del kit |
|------------|-----------|-----------|--------------------|
| Q116-29D | | X | IMG-116-43 |
| Q116-27D | | X | IMG-116-41 |
| Q116-24I | X | | IMG-116-38 |
| Q116-9I | X | | IMG-116-48 |
| Q116-20I | X | | IMG-116-40 |
| Q116-33I | X | | IMG-116-47 |
| Q116-37I | X | | IMG-116-49 |
| Q116-38I | X | | IMG-116-50 |
| Q116-39I | X | | IMG-116-51 |
| Q116-41I | X | | IMG-116-52 |
| Q116-42I | X | | IMG-116-53 |
| Q116-43I | X | | IMG-116-54 |
| Q116-44I | X | | IMG-116-55 |
| Q116-45I | X | | IMG-116-56 |
| Q116-46I | X | | IMG-116-60 |
| Q116-47I | X | | IMG-116-57 |
| Q116-49I | X | | IMG-116-58 |
| Q116-50I | X | | IMG-116-59 |

Tabla 1. Referencias del kit Imegen® Quimera dPCR Dry.

Estas instrucciones de uso son adecuadas para el análisis de cualquiera de los 33 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.

El kit Imegen® Quimera dPCR Dry está dirigido a profesionales de la salud e investigadores capacitados en técnicas de biología molecular en general y en la realización de PCR digital en particular, que necesiten diferenciar y cuantificar poblaciones de células donantes derivadas de muestras de ADN humano mixto, como muestras post-trasplante.

03 Características técnicas

Imegen® Quimera dPCR Dry consiste en un ensayo que permite llevar a cabo la cuantificación por PCR digital 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 absoluta de un marcador informativo o la cantidad relativa en relación a la cantidad del gen de referencia, β -globina.

El tipo de muestra empleada en la validación de estos kits **Imegen® Quimera dPCR Dry**, es ADN genómico extraído de muestras de sangre periférica o de médula ósea provenientes de pacientes sometidos a un trasplante alogénico de células madre. A continuación, se detallan las especificaciones técnicas del kit:

- ◇ **Tipo de muestra:** ADN genómico de sangre periférica, médula ósea y subtipos celulares.
- ◇ **Cantidad de ADN:** 75 ng (Bio-Rad) y 150 ng (ThermoFisher Scientific)
- ◇ **Límite de cuantificación:** 0.05%
- ◇ **Número de reacciones por muestra:** 1
- ◇ **Número de dianas:** 2
- ◇ **Tiempo de trabajo manual:** 15 min – 1 h 30 min
- ◇ **Duración del programa de dPCR:** 1 h 30 min – 3 h
- ◇ **Plataformas de dPCR:**
 - ↳ QuantStudio™ 3D Digital PCR System (ThermoFisher Scientific)
 - ↳ QuantStudio™ Absolute Q™ PCR System (ThermoFisher Scientific)
 - ↳ QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad)

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 u 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 los reactivos liofilizados necesarios para llevar a cabo 12 determinaciones de PCR digital:

- **Marcador* *Master Mix***: oligonucleótidos necesarios para la amplificación del marcador objeto de análisis (polimorfismo) y del gen de referencia (β -globina), dos sondas marcadas, una con FAM™ para la detección del marcador y una con VIC™ para la detección específica de la β -globina que sirve como referencia activa para la cuantificación.

| Reactivos | Cantidad | Conservación |
|-----------------------------------|-----------|--------------|
| Marcador <i>Master Mix</i> | 2 x 6 rxn | 4°C |

Tabla 2. Componentes del kit Imegen® Quimera dPCR Dry.

(*) Este reactivo es específico para cada marcador referenciado en la Tabla 1.

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

➤ Micropipetas (10 µL, 20 µL y 200 µL)

QuantStudio™ 3D Digital PCR (ThermoFisher Scientific)

- + QuantStudio 3D Digital PCR (cargador de chips)
- + ProFlex™ 2x Flat PCR System (termociclador dPCR)
- + QuantStudio 3D Digital PCR instrument (lector de chips)

QuantStudio™ Absolute Q™ PCR (ThermoFisher Scientific)

- + QuantStudio™ Absolute Q Digital PCR System, desktop (dPCR thermalcycler)

Droplet Digital™ PCR (Bio-Rad)

- + QX200™ Droplet Digital™ PCR system o QX100™ Droplet Digital™ PCR system
- + PX1™ PCR Plate Sealer
- + C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module

Reactivos:

➤ Agua libre de nucleasas

QuantStudio™ 3D Digital PCR (ThermoFisher Scientific)

- + QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix v.2
- + Etanol absolute

QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR (ThermoFisher Scientific)

- + Absolute Q DNA Digital PCR Master Mix (Ref. A52490)
- + Isolation Buffer (Ref. A52730)

Droplet Digital™ PCR (Bio-Rad)

- + ddPCR™ Supermix for probes (No dUTP)
- + Droplet generation oil for probes

Materiales:

- Tubos estériles de 0.2 mL y 1.5 mL
- Pipette filter tips (10 µL, 20 µL y 200 µL)
- Guantes de látex sin polvo

QuantStudio™ 3D Digital PCR (ThermoFisher Scientific)

- + QuantStudio® 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2 (12 pack) (Ref.A26316)
- + Paños de precision

QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR (ThermoFisher Scientific)

- + MAPI6 Plate Kit (Ref. A52865)

Droplet Digital™ PCR (Bio-Rad)

- + Droplet Generator Cartridges and Gaskets (Ref.1864007)
- + Placas de 96 pocillos para ddPCR (Ref.12001925)
- + Film térmico perforable (Ref.1814040)

Kits complementarios

El paso previo a la cuantificación de un marcador informativo por PCR digital, consiste en determinar por PCR en tiempo real la informatividad de los posibles polimorfismos. Para ello, Health in Code, S.L. ha diseñado, desarrollado y fabricado los siguientes kits.

| Nombre del kit | Referencia |
|---------------------------------------------|------------|
| Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus | IMG-116-26 |
| Imegen® Quimera Screening Multiplex Plus II | IMG-116-25 |

Tabla 3. Kits de Screening de marcadores.

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de los reactivos

El primer paso antes de empezar el protocolo de ensayo es rehidratar los reactivos liofilizados con un volumen de agua libre de nucleasas según el equipo de dPCR elegido, tal y como se especifica en la Tabla 4.

Con el objetivo de facilitar la resuspensión y homogeneización de los reactivos, se recomienda agitar y dar un spin a los tubos que contienen los reactivos y conservarlos a 4°C, protegidos de la luz, durante una hora antes de su uso. Si este reactivo no va a ser utilizado inmediatamente tras la rehidratación, se recomienda conservar a -20 °C hasta su uso.

| Equipo | Volumen agua libre de nucleasas |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| QuantStudio™ 3D Digital PCR System (ThermoFisher Scientific) | 10 µL |
| QuantStudio™ Absolute Q™ PCR system (ThermoFisher Scientific) | 15 µL |
| Droplet Digital™ PCR system (BIO-RAD) | 10 µL |

Tabla 4. Volumen de agua libre de nucleasas para la rehidratación de los reactivos que componen el kit Imegen® Quimera dPCR Dry, según el equipo utilizado para el ensayo

07.2 | Preparación de las reacciones de amplificación

El ensayo deberá incluir las siguientes reacciones:

- ◇ Reacción de cada muestra.
- ◇ Recomendado: Reacción de control negativo (reacción que contiene agua en lugar de ADN para garantizar la ausencia de contaminación en el proceso).
- ◇ Opcional: Si se desea determinar la celularidad del marcador informativo seleccionado, se recomienda analizar la muestra pretrasplante del receptor. Este análisis permitirá determinar si el receptor es homocigoto o heterocigoto para el marcador seleccionado y así corregir la carga alélica para obtener la celularidad.

Cada *mix* de PCR estará formado por:

- + Marcador *Master Mix* (Marcador *Master Mix* + *Master Mix* β-globina)
- + *Master Mix General* (no incluido en el kit)

A continuación, se detalla el protocolo a seguir para preparar las reacciones de amplificación y llevar a cabo la PCR digital en función de la plataforma que se vaya a utilizar:

- 01 Descongelar los reactivos necesarios para el análisis:
 - ◇ Muestras de ADN genómico diluidas a la concentración óptima (25 ng/μL).
 - ◇ *Master Mix* del marcador (rehidratado).
 - ◇ Agua libre de nucleasas para los controles negativos.
 - ◇ *Master Mix* para PCR digital (no suministrado).
- 02 Agitar los reactivos con *vortex* y dar *spin*.

QuantStudio™ 3D Digital PCR System (ThermoFisher Scientific)

- 03 Añadir la cantidad señalada (Tabla 5), 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 | Volumen por reacción |
|-------------------------------------------|----------------------|
| Marcador <i>Master Mix</i> | 1,5 μL |
| QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix v.2 | 7,5 μL |

Tabla 5. Cantidad de reactivos necesaria por reacción con el sistema QuantStudio™ 3D Digital PCR System

- 04 Mezclar el *mix* de PCR pipeteando, con cuidado para no formar burbujas, y dispensar 9 μL en los tubos de 0.2 mL correspondientes.
- 05 Dispensar 6 μL de ADN de la muestra a 25 ng/μL o de agua libre de nucleasas (control negativo) a los tubos correspondientes.
- 06 Cargar 14.5 μL de la reacción de PCR en el equipo QuantStudio 3D Digital PCR Chip Loader, según las instrucciones del fabricante, para cargar el chip.

QuantStudio™ Absolute Q™ PCR system (ThermoFisher Scientific)

- 03 Agregar los siguientes reactivos en un tubo nuevo de 1.5 mL:

| Reactivo | Volumen por reacción |
|--------------------------------------------|----------------------|
| Marcador <i>Master Mix</i> | 1,5 μL |
| Absolute Q DNA Digital PCR Master Mix (5x) | 2 μL |

Tabla 6. Cantidad de reactivos necesaria por reacción con el sistema QuantStudio Absolute Q PCR system

- 04 Mezclar la *Master Mix* de PCR pipeteando de arriba a abajo con cuidado para no generar burbujas (no agitar con *vortex*) y dispensar 3.5 μL en tubos nuevos de 0.2 mL.
- 05 Agregar 6.5 μL de muestra de ADN a 25 ng/μL, o de agua libre de nucleasas (control negativo) en los tubos que contienen la *Master Mix* de PCR.
- 06 En un ángulo de 45°, cargar 9 μL de la mezcla de reactivos de PCR en el fondo del pocillo de la placa MAPI6 según las instrucciones del fabricante. A continuación, pipetear la mezcla solo hasta el primer tope de la pipeta.
- 07 Cargar 15 μL del tampón de aislamiento, en un ángulo de 45°, el lateral del pocillo por encima del reactivo para evitar que se mezclen o se formen burbujas.

↘ Droplet Digital™ PCR system (BIO-RAD)

- 03 Añadir la cantidad señalada de cada reactivo (Tabla 7) 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 | Volumen por reacción |
|--------------------------------------|----------------------|
| Marcador <i>Master Mix</i> | 1,5 µL |
| ddPCR™ Supermix for probes (No dUTP) | 10 µL |
| Agua libre de nucleasas | 5,5 µL |

Tabla 7. Cantidad de reactivos necesaria por reacción para el ensayo con el sistema Droplet Digital PCR system

- 04 Mezclar el *mix* de PCR pipeteando con cuidado para no formar burbujas y dispensar 17 µL en una placa de 96 pocillos:
- NOTA:** Si alguno de los pocillos de las columnas de la placa que tienen muestras queda vacío, añadir 20 µL de buffer control o agua.
- 05 Dispensar 3 µL de ADN de la muestra a 25 ng/µL o de agua libre de nucleasas (control negativo) a los pocillos correspondientes.
- 06 Cargar 20 µL de la reacción de PCR con la pipeta multicanal en los pocillos correspondientes del cartucho de carga, según las instrucciones del fabricante

07.3 | Configuración del programa de PCR, carga y lectura

↘ QuantStudio™ 3D Digital PCR System (ThermoFisher Scientific)

➤ Cargar las reacciones de amplificación en el chip.

Para el montaje y preparación de todos los dispositivos necesarios para cargar el chip (fungible no incluido) con las reacciones de amplificación preparadas, se recomienda seguir las instrucciones del fabricante del equipo *QuantStudio 3D Digital PCR Chip Loader* (ThermoFisher Scientific). Para ello, seguir las indicaciones del capítulo 3, del manual *MAN0007720 QuantStudio™ 3D Digital PCR System User Guide* disponible en la página web www.thermofisher.com.

➤ Configuración del programa de PCR.

Para la disposición de los chips en el termociclador para dPCR: *ProFlex™ 2x Flat PCR System*, seguir las instrucciones del capítulo 4 del manual *MAN0007720 QuantStudio™ 3D Digital PCR System User Guide* disponible en la página web www.thermofisher.com.

◇ Programa óptimo:

| Campos | Etapa 1 Activación enzimática | Etapa 2 PCR | | Etapa 3 | |
|--------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------|---------------|--------------|
| Nº de ciclos | 1 ciclo inicial (desnat.) | 40 ciclos | | 1 ciclo final | Conservación |
| | | Anillamiento/ Extensión | Desnaturalización | | |
| Temperatura | 96°C | 56°C | 98°C | 60°C | 10°C |
| Tiempo | 10 minutos | 2 minutos | 30 segundos | 2 minutos | ∞ |

Tabla 8. Programa de PCR óptimo para los kits Imegen® Quimera dPCR Dry con el sistema QuantStudio 3D Digital PCR system.

➤ **Lectura de los chips y obtención de los resultados.**

Una vez terminado el programa de PCR, seguir las instrucciones del capítulo 5 del manual *MAN0007720 QuantStudio™ 3D Digital PCR System User Guide* disponible en la página web www.thermofisher.com, para obtener los ficheros resultantes de la lectura de los chips.

↘ **QuantStudio™ Absolute Q™ PCR system (ThermoFisher Scientific)**

➤ **Carga de placa de matriz de microfluidos (MAP).**

Ensamble las tiras de tapas de la placa MAP en las 4 columnas de pocillos. Asegúrese de cubrir las columnas por completo y colocar tiras de tapas de la placa MAP en todas las columnas, incluidas las columnas no utilizadas. Seguir las instrucciones del Capítulo 2, de la guía del usuario: *MAN0025621 QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System User Guide* disponible en su sitio web www.thermofisher.com.

➤ **Configuración del programa de PCR.**

Colocar la placa MAP en el *QuantStudio™ Absolute Q™ System* y seleccionar el protocolo de la lista y modifique los canales óptimos y los parámetros de PCR según sea necesario. Para facilitar el cálculo del quimerismo:

◇ Configuración del experimento:

| Análisis | Diana | Análisis |
|----------|----------------------|----------|
| FAM | Marcador informativo | CNV |
| VIC | Beta-globina | CNV Ref |

Tabla 9. Experimento configurado en el sistema QuantStudio Absolute Q PCR system

◇ Programa óptimo:

| Campos | Etapa 1 Activación enzimática | Etapa 2 PCR | |
|--------------|----------------------------------------|-------------------|-------------------------|
| Nº de ciclos | 1 ciclo inicial (desnaturalización) | 40 ciclos | |
| | | Desnaturalización | Anillamiento/ Extensión |
| Temperatura | 96°C | 96°C | 60°C |
| Tiempo | 10 minutos | 5 segundos | 15 segundos |

Tabla 10. Programa de PCR óptimo para el sistema QuantStudio Absolute Q PCR System.

➤ Lectura de arrays y obtención de resultados.

Una vez completada la ejecución de la PCR, siga las instrucciones de la guía del usuario del sistema de PCR digital *QuantStudio™ Absolute Q* disponible en el sitio web www.thermofisher.com.

↘ Droplet Digital™ PCR system (BIO-RAD)

➤ Cargar las reacciones de PCR en el cartucho de carga.

Para el montaje y preparación de todos los dispositivos necesarios para cargar el cartucho (fungible no incluido) con las reacciones de amplificación preparadas, recomendamos seguir las instrucciones del fabricante del equipo *QX200™ Droplet Digital™ PCR system* o *QX100™ Droplet Digital™ PCR system* (BIO-RAD). Para ello, seguir las instrucciones del capítulo 2 apartado *ddPCR Experimental Workflow>Droplet Generation*, del manual *Droplet Digital™ PCR Applications Guide* disponible en la página web www.bio-rad.com.

➤ Configuración del programa de PCR.

Poner la placa ddPCR de 96 pocillos en el *C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module*:

◇ Programa óptimo:

| Campos | Etapa 1 Activación enzimática | | Etapa 2 PCR | | Etapa 3 | |
|--------------------|-------------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------|---------------|--------------|
| | Nº de ciclos | 1 ciclo inicial (desnat.) | 40 ciclos | | 1 ciclo final | Conservación |
| Desnaturalización | | | Anillamiento/ Extensión | 98°C | | |
| Temperatura | 96°C | 94°C | 60°C | 98°C | 4°C | |
| Tiempo | 10 minutos | 30 segundos | 1 minuto | 10 minutos | ∞ | |

Tabla 11. Programa de PCR óptimo para los kits *Imegen® Quimera dPCR* con la plataforma *BIO-RAD*.

➤ Lectura de la fluorescencia de la placa y obtención de los resultados.

Una vez terminado el programa de PCR, seguir las instrucciones del capítulo 2 y, en concreto de los apartados *Setting Up and Experiment in Quantasoft™ Software y Droplet Reading*, del manual *Droplet Digital™ PCR Applications Guide* disponible en la página web www.bio-rad.com, para obtener los ficheros resultantes de la lectura de la placa. Como tipo de experimento habrá que seleccionar la opción **RED: rare target sequence detection (rare event detection)**.

08 Análisis de los resultados

Para el análisis de los resultados es importante conocer el marcaje de las sondas que detectan cada una de las dos dianas analizadas con el kit:

| Sonda | Marcaje |
|----------------------|---------|
| β -globina | VIC™ |
| Marcador informativo | FAM™ |

Tabla 12. Marcaje de las sondas utilizadas

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

- **Controles Negativos (NTC).** Confirmar que no hay señales de amplificación para ninguna de las dianas (FAM y VIC). En caso de detectar amplificación, se debe repetir el ensayo para descartar la posibilidad de una contaminación accidental.
- La cuantificación del quimerismo hematopoyético se expresa como una medida relativa del número de copias del marcador informativo, en relación con la cantidad del gen de referencia, la beta-globina. El % de quimerismo molecular se calcula utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Quimera} = \frac{\text{Marcador informativo} \frac{\text{Copias}}{\mu\text{L}}}{\beta - \text{globina} \frac{\text{Copias}}{\mu\text{L}}} \times 100$$

↘ QuantStudio™ 3D Digital PCR System (ThermoFisher Scientific)

Para el análisis de los resultados se utiliza el *QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ Software* de ThermoFisher Scientific. Por tanto, se recomienda seguir las instrucciones del capítulo 5 del manual *MAN0007720 QuantStudio™ 3D Digital PCR System User Guide* disponible en la página web www.thermofisher.com. Este manual, dispone de un apartado de "Troubleshooting", donde se especifican las posibles soluciones frente a un problema que surja durante el ensayo.

Además, para un análisis correcto de los resultados se deben 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.
- ◇ En caso de ser necesario, revisar y editar el resultado de la lectura del chip en el apartado

"Review data" del software y finalmente emplear los datos de copias/ μ L (FAM) y copias/ μ L (VIC) de la pestaña "see results" del software de análisis.

↳ QuantStudio™ Absolute Q™ PCR system (ThermoFisher Scientific)

El software *QuantStudio Absolute Q Digital PCR* de ThermoFisher Scientific se utiliza para el análisis de los resultados. Para la interpretación de estos, se recomienda seguir las instrucciones del Capítulo 3 'Análisis de datos', de la guía del usuario: *MAN0025621 QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System User Guide* disponible en www.thermofisher.com. Esta guía dispone de una sección de "Troubleshooting", para resolver problemas que surgen durante el ensayo.

- ◇ Revisar y, en su caso, editar manualmente los resultados obtenidos para cada muestra accediendo a la pestaña "Analysis".
- ◇ Para analizar y revisar los resultados, acceda a la pestaña "Results" y exportar los resultados como un archivo CSV.

↳ Droplet Digital™ PCR system (BIO-RAD)

Para el análisis de los resultados se utiliza el *QuantaSoft™ Software* de BIO-RAD. Se aconseja seguir las instrucciones del capítulo 2 y, en concreto del apartado *Data analysis* del manual *Droplet Digital™ PCR Applications Guide* disponible en la página web www.thermofisher.com. Este manual dispone de un apartado de "Troubleshooting", para solución de problemas durante el ensayo.

- ◇ En caso de ser necesario, revisar y editar el resultado. Finalmente utilizar los datos de "concentration (copias/ μ L)" para el marcador (FAM) y "concentration (copias/ μ L)" para el gen de referencia (VIC) de la pestaña "Analyze > Concentration" del software de análisis.

↘ Imegen®-Quimera Software, by Health in Code S.L Aplicación de seguimiento de pacientes

Health in Code, S.L. ha diseñado y desarrollado una aplicación (Figura 1) de fácil manejo que le permite al usuario crear una base de datos de pacientes, así como registrar los resultados del screening de marcadores informativos, las cuantificaciones del marcador 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

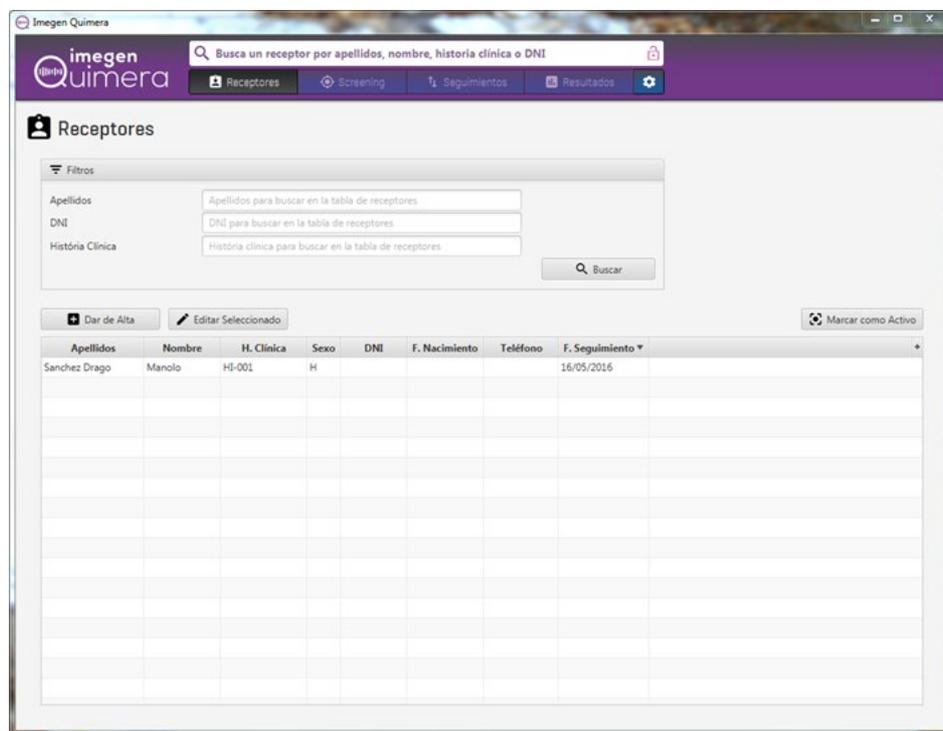


Figura 2. Vista de la aplicación de seguimiento de pacientes desarrollada por Health in Code S.L.

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

09 Troubleshooting

En la tabla 13, se indica gráficamente los posibles resultados que pueden obtenerse del análisis de los diferentes controles y de una muestra de ADN genómico en un ensayo, así como su interpretación y las causa dicho resultado:

| Control | Marcador | β -Globina | Causa |
|-------------------------|----------|------------------|---------------------------------------------------|
| Muestra de ADN | + | + | Resultado esperado |
| | - | - | Fallo de amplificación de la muestra ¹ |
| Control negativo de PCR | - | - | Resultado esperado |
| | + | + | Contaminación con ADN humano ² |

Tabla 13. Interpretación de los posibles resultados obtenidos en el ensayo con Imegen® Quimera dPCR Dry

(1) **Fallo de amplificación de la muestra:** comprobar 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, un segundo análisis o extracción de ADN serían recomendables antes de realizar una interpretación de los resultados.

(2) **Contaminación de la PCR 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. 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.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

Imegen® Quimera dPCR Dry ha sido validado usando las siguientes plataformas de PCR digital:

- + *QuantStudio™ 3D Digital PCR system (ThermoFisher Scientific)*
- + *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR system (ThermoFisher Scientific)*
- + *QX200™ Droplet Digital™ PCR system y QX100™ Droplet Digital™ PCR system (BIO-RAD)*

Si usa otra marca o modelo de equipo de PCR digital para la cuantificación de quimerismo hematopoyético, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con el departamento técnico para cualquier consulta o aclaración.

10.2 | Reactivos

Los kits Imegen® Quimera dPCR Dry han sido validados empleando 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 digital, especificados en el apartado 6 de este manual (Equipos, reactivos y materiales que no se suministran).

En caso de duda o aclaración, 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 por el fabricante, 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 dPCR Dry** está diseñado para el análisis de ADN genómico (ADNg) total extraído a partir de muestras de sangre periférica o médula ósea.

Para la validación analítica del kit **Imegen® Quimera dPCR Dry** se han utilizado un total de 48 muestras de referencia (Coriell®) o del repositorio interno de Health in Code, S.L. previamente analizadas para identificar la presencia/ausencia de los polimorfismos de interés de tal modo que hubiera una muestra positiva y otra negativa para cada marcador.

11.2 | Límite de cuantificación (LOQ)

Para determinar el límite de cuantificación (LOQ, del inglés *limit of quantification*) del kit **Imegen® Quimera dPCR Dry**, se han preparado diluciones de la muestra positiva para el marcador informativo con una negativa asegurando una frecuencia alélica del marcador al 5%, 0.5% y 0.05%.

Cada marcador fue evaluado por triplicado a partir de la dilución preparada. Para eliminar el posible ruido de fondo de la técnica, se realizó una corrección incluyendo en el ensayo la muestra negativa para el marcador evaluado. La señal producida por la muestra negativa se extrae de la señal obtenida en la mezcla. A continuación, se calculó la cuantificación relativa del marcador frente al gen endógeno de referencia (β -globina).

Los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación para establecer el límite de cuantificación al 0.05% (CV < 25%).

11.3 | Especificidad

La especificidad analítica del kit **Imegen® Quimera dPCR Dry** se determinó analizando una muestra negativa para cada marcador. En ningún caso se detectó señal para el marcador evaluado por encima del LOQ establecido en las muestras negativas correspondientes.

11.4 | Reproducibilidad y repetibilidad

Los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad del kit **Imegen® Quimera dPCR Dry** se han evaluado con muestras reales de ADN_g para los tres equipos especificados en la sección "10.1 Equipos".

Para ello, se analizaron por marcador y equipo 6 réplicas de una muestra positiva previamente diluida al LOQ establecido previamente (0.05%), siendo un total de 594 reacciones. Los sistemas diseñados para cada marcador muestran una excelente precisión para todos los equipos evaluados (QuantStudio™ 3D y Absolute Q™ Digital PCR system (ThermoFisher Scientific) y QX200™ Droplet Digital™ PCR system (BIO-RAD)) al cumplir, en todos los casos, el criterio de aceptación previamente establecidos (CV < 25%). Estos resultados están resumidos en la Tabla 14.

Adicionalmente, se han ampliado los ensayos de reproducibilidad para evaluar el rendimiento de 7 de los 33 marcadores a diferentes frecuencias (5% y 0.5%) en los tres equipos. A medida que aumenta la presencia del marcador analizado, el CV disminuye. De este modo, se concluye que a frecuencias superiores al LOQ los sistemas también son precisos y reproducibles (CV < 25%) (datos no mostrados).

| Marcador | QuantStudio™ 3D Digital PCR system | | QX200™ Droplet Digital™ (Bio-Rad) | | QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR system | |
|----------|------------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|---------------------------------------------|--------|
| | Media (%) | CV (%) | Media (%) | CV (%) | Media (%) | CV (%) |
| SRY | 0.05 | 12.23 | 0.06 | 20.70 | 0.06 | 21.57 |
| RhD | 0.04 | 24.63 | 0.05 | 17.60 | 0.04 | 7.20 |
| Q116-6I | 0.07 | 24.03 | 0.03 | 22.90 | 0.05 | 11.44 |
| Q116-3I | 0.05 | 17.98 | 0.03 | 12.90 | 0.06 | 3.62 |
| Q116-7I | 0.03 | 10.53 | 0.03 | 19.61 | 0.05 | 3.26 |
| Q116-12D | 0.06 | 17.8 | 0.02 | 10.20 | 0.06 | 16.89 |
| Q116-11I | 0.08 | 8.08 | 0.05 | 23.10 | 0.06 | 7.93 |
| Q116-5I | 0.06 | 6.13 | 0.05 | 2.80 | 0.05 | 9.29 |
| Q116-4I | 0.04 | 18.16 | 0.05 | 18.30 | 0.04 | 8.60 |
| Q116-10I | 0.05 | 20.96 | 0.02 | 21.00 | 0.05 | 7.13 |
| Q116-23I | 0.04 | 6.4 | 0.05 | 6.90 | 0.04 | 4.87 |
| Q116-28I | 0.07 | 13.4 | 0.04 | 5.50 | 0.05 | 6.65 |
| Q116-32I | 0.05 | 18.01 | 0.03 | 24.00 | 0.04 | 7.26 |
| Q116-31I | 0.05 | 13.97 | 0.03 | 20.00 | 0.05 | 1.65 |
| Q116-30D | 0.02 | 12.79 | 0.03 | 19.50 | 0.05 | 11.41 |
| Q116-29D | 0.06 | 14.83 | 0.02 | 3.20 | 0.07 | 8.87 |
| Q116-27D | 0.05 | 2.25 | 0.04 | 23.87 | 0.05 | 1.77 |
| Q116-24I | 0.06 | 16.88 | 0.05 | 23.80 | 0.05 | 7.54 |
| Q116-33I | 0.05 | 23.7 | 0.04 | 13.26 | 0.06 | 4.02 |
| Q116-37I | 0.04 | 21.65 | 0.05 | 9.40 | 0.04 | 7.44 |

| Marcador | QuantStudio™ 3D Digital PCR system | | QX200™ Droplet Digital™ (Bio-Rad) | | QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR system | |
|----------|------------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|---------------------------------------------|--------|
| | Media (%) | CV (%) | Media (%) | CV (%) | Media (%) | CV (%) |
| Q116-38I | 0.04 | 8.57 | 0.07 | 10.10 | 0.06 | 9.59 |
| Q116-39I | 0.07 | 6.95 | 0.03 | 7.50 | 0.07 | 13.19 |
| Q116-41I | 0.06 | 9.12 | 0.03 | 9.30 | 0.06 | 19.85 |
| Q116-42I | 0.05 | 17.05 | 0.05 | 11.40 | 0.05 | 16.28 |
| Q116-43I | 0.03 | 14.95 | 0.05 | 23.80 | 0.05 | 8.70 |
| Q116-44I | 0.05 | 17.64 | 0.03 | 15.80 | 0.05 | 15.98 |
| Q116-45I | 0.04 | 12.48 | 0.03 | 4.00 | 0.05 | 1.42 |
| Q116-47I | 0.08 | 17.58 | 0.12 | 6.60 | 0.05 | 10.46 |
| Q116-49I | 0.05 | 9.39 | 0.17 | 15.20 | 0.047 | 5.49 |
| Q116-50I | 0.06 | 14.29 | 0.04 | 6.30 | 0.03 | 21.42 |
| Q116-20I | 0.04 | 13.88 | 0.03 | 13.50 | 0.05 | 17.04 |
| Q116-9I | 0.06 | 6.09 | 0.04 | 11.40 | 0.05 | 9.83 |
| Q116-46I | 0.05 | 23.7 | 0.05 | 10.70 | 0.04 | 7.25 |

Tabla 14. Reproducibilidad del kit Imegen® Quimera dPCR Dry. Se muestra el coeficiente de variación (CV) para cada marcador y equipo evaluado.

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

