Instrucciones de uso

Imegen® Factor V dPCR

Ref. IMG-332

RUO

Genotipado de la c.1601G> A; p.Arg534Gln (R506Q) mutación en el gen F5 (Leiden) por PCR digital

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. garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales utilizados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se extiende hasta la fecha de vencimiento, siempre que se cumplan las condiciones de almacenamiento especificadas en este manual.

Nuestros productos están diseñados para uso exclusivo en investigación. Health in Code, S.L. no ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que vaya más allá del correcto funcionamiento de los componentes de este kit. La única obligación de Health in Code, S.L., con respecto a las garantías anteriores, será reemplazar el producto o devolver el precio de compra, cuando lo desee el cliente, siempre que se demuestre la existencia de un defecto en los materiales o en la fabricación de sus productos. Health in Code, S.L. no es responsable por ningún daño, directo o indirecto, que resulte en una pérdida económica o que resulte del uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos vendidos por Health in Code, S.L. están sujetos a un riguroso control de calidad. Imegen® Factor V dPCR ha pasado todas las pruebas de validación interna, asegurando la confiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

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 (IUF)		
Versión 05	DIC 2023	Revisión y actualización de la sección 3 "Características técnicas".
Versión 04	FEB 2023	Corrección en la asignación del homocigoto mutante y el homocigoto nativo en el apartado 8.
Versión 03	DIC 2022	Cambio de dirección del fabricante: Health in Code S.L., Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España.
Versión 02	SEP 2022	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a HEALTH IN CODE, S.L.
Versión 01	JUL 2019	Modificación del contenido.

índice

01 **Información general** 4

02 **Uso previsto** 5

03 **Características técnicas** 6

04 **Advertencias y precauciones de seguridad** 7

05 **Contenido y condiciones de almacenamiento del kit** 8

06 **Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran** 9

07 **Protocolo de ensayo** 11

- 07.1 | Preparación de los reactivos de PCR 11
- 07.2 | Configuración del ensayo de PCR 11
- 07.3 | Configuración del programa de PCR digital 13

08 **Análisis de los resultados** 15

09 **Troubleshooting** 18

10 **Limitaciones** 19

- 10.1 | Equipos 19
- 10.2 | Reactivos 19
- 10.3 | Estabilidad del producto 19

01 Información general

El gen *F5*, ubicado en la región del cromosoma 1q24.2, codifica el factor de coagulación V, una glucoproteína plasmática que circula con poca o ninguna actividad. La forma activa del Factor V (Factor Va) es esencial para el proceso de coagulación y actúa como un cofactor en la activación de la protrombina (Factor II). Los factores de coagulación son un grupo de proteínas relacionadas que son esenciales para la coagulación sanguínea normal (hemostasia). Después de una lesión, los coágulos protegen el cuerpo sellando los vasos sanguíneos dañados y evitando una mayor pérdida de sangre.

El sistema de coagulación está controlado por varias proteínas, incluida una proteína llamada proteína C activada (APC). APC normalmente desactiva el factor de coagulación V, lo que retrasa el proceso de coagulación y evita que los coágulos crezcan demasiado. Sin embargo, en las personas con factor V de trombofilia de Leiden, el factor de coagulación V no puede inactivarse normalmente por APC. Como resultado, el proceso de coagulación permanece activo por más tiempo de lo habitual, lo que aumenta la posibilidad de desarrollar coágulos de sangre anormales.

Otros factores también aumentan el riesgo de desarrollar coágulos sanguíneos en las personas con trombofilia por factor V de Leiden. Estos factores incluyen el aumento de la edad, la obesidad, las lesiones, la cirugía, el tabaquismo, el embarazo y el uso de anticonceptivos orales (píldoras anticonceptivas) o la terapia de reemplazo hormonal. El riesgo de coágulos anormales también es mucho mayor en personas que tienen una combinación del factor V de mutación de Leiden y otra mutación en el gen *F5*. Además, el riesgo aumenta en las personas que tienen la mutación del factor V Leiden junto con una mutación en otro gen involucrado en el sistema de coagulación.

Referencias

- *Rosendaal FR, Reitsma PH. Genetics of venous thrombosis. J Thromb Haemost. 2009;7: 301–304.*
- *Rosendorff A, Dorfman DM. Activated protein C resistance and factor V Leiden: a review. Arch Pathol Lab Med. 2007;131: 866–71.*
- *Segal JB, Brotman DJ, Necochea AJ, Emadi A, Samal L, Wilson LM, et al. Predictive Value of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A in Adults With Venous Thromboembolism and in Family Members of Those With a Mutation. JAMA. 2009;301: 2472.*

02 Uso previsto

Imegen® Factor V dPCR emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescente en un ensayo de diagnóstico de PCR digital cualitativo dirigido a amplificar y detectar simultáneamente el genotipo nativo *F5* (c.1601G) y la mutación particular en el gen *F5* (c.1601A; p. Arg534Gln) que causa factor V Leiden trombofilia, un déficit en la actividad enzimática. Esta deficiencia se ha asociado con trombofilia hereditaria, síndrome de Budd-Chiari, accidente cerebrovascular y susceptibilidad ligeramente mayor a la pérdida recurrente de embarazo.

Este análisis genético permite al usuario detectar la presencia o ausencia de dichos genotipos en una sola reacción multiplexada, ya que cada objetivo se marca con un fluoróforo diferente. La presencia del genotipo nativo (c.1601G) se incluye como un control de la calidad e integridad del ADN.

El ensayo analiza el genotipo en la línea germinal, por lo que el tipo de muestra óptimo requerido para este análisis es el ADN genómico (ADNg). Cada reacción utiliza un total de 30 ng de ADNg.

Imegen® Factor V dPCR ha sido diseñado para uso exclusivo en investigación y está dirigido a profesionales del sector de biología molecular.

03 Características técnicas

Imegen® Factor V dPCR consiste en un ensayo de PCR de punto final destinado a cuantificar mediante PCR digital el número de copias de los objetivos. El ensayo se ha validado con ADN genómico (ADNg) extraído de sangre periférica de muestras de diagnóstico que previamente se habían genotipado utilizando una técnica diferente, así como muestras de referencia obtenidas en *Coriell Research Institute*. La validación completa proporciona un método de diagnóstico robusto y específico.

Para el uso del kit seco Imegen® Factor V dPCR es necesario un sistema de PCR digital con los canales de fluorescencia: FAM™ y VIC™ (HEX).

El tipo de muestra requerido para este análisis es el ADN genómico extraído de sangre periférica, será necesaria una cantidad total de 60 ng. El límite de detección (LOD) se establece en 10 ng 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 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

El kit contiene reactivos para realizar determinaciones de 48 dPCR:

- ***Factor V Master Mix***: *master mix* liofilizada que contiene los oligonucleótidos y las sondas de hidrólisis para la amplificación multiplexada del genotipo nativo y el mutado asociado a Leiden. El genotipo *F5* nativo y mutado *F5* están marcados con fluoróforos VIC™ y FAM™, respectivamente.
- ***Factor V Control***: el control positivo acuoso es heterocigoto para la transición de G a A en la posición c.1601 del gen Leiden (c.1601G> A; p. Arg534Gln).

Reactivos	Cantidad	Conservación
Factor V Master Mix	4 x 12 rxn	4°C
Factor V Control	60 µl	4°C

Tabla 1. Contenido y temperatura de almacenamiento

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Micropipeta (10 µL, 20 µL y 200 µL)

↘ QuantStudio 3D Digital PCR (Thermo Fisher Scientific)

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

↘ 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 (Thermo Fisher Scientific)

- *QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix v.2*
- *Ethanol* absoluto

↘ Droplet Digital PCR (Bio-Rad)

- *ddPCR™ Supermix for probes (No dUTP)*
- Aceite de generación de gotitas para sondas.

Materiales:

- Tubos estériles de 0.2 mL y 1.5 mL
- Puntas de filtro de pipeta. (10 µL, 20 µL y 200 µL)
- Guantes

↘ QuantStudio 3D Digital PCR (Thermo Fisher Scientific)

- *QuantStudio® 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2* (paquete de 12) (Ref.A26316)
- Toallas libres de polvo.

↘ **Droplet Digital PCR** (Bio-Rad)

- Cartuchos y juntas generadores de gotas (Ref.1864007)
- Placas ddPCR de 96 pocillos (Ref.12001925)
- Sellado térmico de placa de PCR perforable (Ref.1814040)

Kits complementarios

Los ensayos de hematología relacionados incluyen:

Nombre del kit	Referencia
Imegen® Factor II dPCR (PCR Digital)	IMG-331
Imegen® Factor II (PCR en tiempo real)	IMG-214
Imegen® HFE (PCR en tiempo real)	IMG-218
Imegen® Cambridge II (PCR en tiempo real)	IMG-199
Imegen® Factor XII (PCR en tiempo real)	IMG-215
Imegen® MTHFR (PCR en tiempo real)	IMG-212
Imegen® MTHFRII (PCR en tiempo real)	IMG-216

Tabla 2. Kits de hematología utilizando PCR en tiempo real o PCR digital

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de los reactivos de PCR

El primer paso antes de usar el kit consiste en rehidratar la mezcla maestra de Factor V:

Reactivos	Volumen del agua libre de nucleasa
Factor V Master Mix	20 µL de agua/vial

Tabla 3. Rehidratación de reactivos liofilizados

Para una resuspensión óptima de cada componente, recomendamos mezclar bien el contenido y girar los tubos antes de dejarlos reposar durante una hora a 4 °C. Si los reactivos no se utilizarán después de la rehidratación, recomendamos el almacenamiento a -20 ° C.

El control positivo se proporciona en fase acuosa y se recomienda un almacenamiento a largo plazo a -20°C.

07.2 | Configuración de la prueba de PCR

El ensayo debe incluir las siguientes reacciones:

- Muestra desconocida
- Control positivo (Control Factor V).
- Recomendado: Reacción de control negativo (esta reacción contiene agua libre de nucleasas, para garantizar la ausencia de contaminación en el proceso).

Configurar las reacciones de la PCR digital siguiendo el protocolo a continuación:

01 Descongele todos los reactivos necesarios para el análisis, incluidos:

- Muestras de ADN genómico. Diluido a la concentración óptima de 10 ng/µL.
- *Factor V Master Mix* (rehidratado).
- *Control Factor V*.
- Agua libre de nucleasas para los controles negativos (sin controles de plantilla, NTC).
- *Digital PCR Master Mix* (no suministrado).

02 Agite en *vórtex* y haga girar cada reactivo para mezclar bien y mantener en hielo. La PCR variará dependiendo del sistema de PCR digital utilizado:

QuantStudio® 3D Digital PCR system (Thermo Fisher Scientific)

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

Reactivos	Cantidad por reacción
Factor V Master Mix	1.5 µL
QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix v.2	7.5 µL

Tabla 4. Cantidad de reactivos necesarios para realizar un análisis con QuantStudio 3D dPCR

NOTA: para estimar la cantidad total de reactivos, recomendamos realizar los cálculos teniendo en cuenta el número de muestras que se analizarán simultáneamente, y agregar un 10% adicional del volumen de cada reactivo.

04 Mezcle el tubo *PCR Master Mix* pipeteando arriba y abajo cuidadosamente para no crear burbujas (no agitar) y dispense 9 µL en los tubos correspondientes de 0,2 mL.

05 Agregue 6 µL de muestra de ADN a 10 ng / µL, o de agua libre de nucleasas (control negativo) en los tubos correspondientes.

06 Cargue 14.5 µL de la reacción de PCR en el cargador de chips de PCR digital *QuantStudio 3D*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante para cargar el chip.

Droplet Digital™ PCR system (Bio-Rad)

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

Reactivos	Cantidad por reacción
Factor V Master Mix	1.5 µL
ddPCR™ Supermix for probes (No dUTP)	10 µL
Agua libre de nucleasa	2.5 µL

Tabla 5. Cantidad de reactivos necesarios para realizar un análisis con el Droplet Digital PCR

NOTA: para estimar la cantidad total de reactivos, recomendamos realizar los cálculos teniendo en cuenta el número de muestras que se analizarán simultáneamente, y agregar un 10% adicional al volumen de cada reactivo.

04 Mezcle el tubo de mezcla maestra de PCR pipeteando arriba y abajo con cuidado para no crear burbujas (no agitar) y dispense 14 µL de los volúmenes especificados en una placa nueva de 96 pocillos.

NOTA: si alguno de los pocillos en las columnas de la placa con muestras está vacío, agregue 20 µL de control de tampón o agua libre de nucleasas.

05 Agregue 6 µL de muestra de ADN a 10 ng/µL, o de agua libre de nucleasas (control negativo) en los pocillos correspondientes.

06 Cargue 20 µL de la reacción de PCR con la pipeta multicanal en los pocillos correspondientes del cartucho de carga, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

07.3 | Configuración del programa de PCR digital

QuantStudio® 3D Digital PCR system (Thermo Fisher Scientific)

Carga del chip:

Para cargar, ensamblar y sellar correctamente los chips dPCR (no se incluyen los fungibles), siga las instrucciones del fabricante. Descargue la guía del usuario: MAN0007720 La Guía del usuario del sistema de *PCR digital 3D QuantStudio™* disponible en su sitio web www.thermofisher.com y siga las instrucciones del capítulo 3.

Configuración del programa dPCR:

Para colocar los chips en el termociclador: *ProFlex™ 2x Flat PCR System*, descargue la guía del usuario: MAN0007720 *QuantStudio™ 3D Digital PCR System* Guía del usuario en el sitio web y siga las instrucciones en el capítulo 4.

Programa óptimo:

Campos	Paso 1 Activación enzimática	Paso 2 PCR		Paso 3	
No. de ciclos	1 ciclo inicial (Desnaturalización)	40 ciclos		1 ciclo final	Conservación
		Anillado y extensión	Desnaturalización		
Temperatura	96°C	56°C	98°C	60°C	20°C
Tiempo	10 minutos	2 minutos	30 segundos	2 minutos	∞

Tabla 6. Programa óptimo de dPCR para el sistema QuantStudio 3D dPCR

Análisis de resultados:

Una vez finalizado el programa de PCR, siga las instrucciones del capítulo 5 de la guía del usuario: MAN0007720 Guía del usuario del sistema de PCR digital 3D *QuantStudio™* para recuperar los archivos resultantes de la lectura de los chips.

Droplet Digital™ PCR system (Bio-Rad)

Carga las reacciones de amplificación en el cartucho:

Para preparar las emulsiones de muestra de aceite y transferir las emulsiones a los cartuchos (fungibles no incluidos), siga las instrucciones del fabricante para uno de los sistemas de *PCR QX200™ Droplet Digital™* o *QX100™ Droplet Digital™ PCR* (Bio-Rad). Descargue la Guía de aplicaciones de PCR *Droplet Digital™* disponible en el sitio web de Bio-Rad www.bio-rad.com y siga las instrucciones en el capítulo 2, *Sección ddPCR Flujo de trabajo experimental > Generación de gotas*.

Configuración del programa dPCR:

Coloque la placa dPCR de 96 pocillos en el ciclador térmico *C1000 Touch™* con el módulo de reacción de 96 pocillos profundos y configure el siguiente programa de PCR.

◊ Programa óptimo:

Campos	Paso 1 Activación enzimática	Paso 2 PCR		Paso 3	
No. de ciclos	1 ciclo inicial (Desnaturalización)	40 ciclos		1 ciclo final	Conservación
		Desnaturalización	Anillado y extensión		
Temperatura	96°C	94°C	60°C	98°C	20°C
Tiempo	10 minutos	30 segundos	1 minuto	10 minutos	∞

Tabla 7. Programa óptimo de dPCR para la plataforma Bio-Rad dPCR

↘ Lectura de la placa de fluorescencia y obtención de resultados:

Una vez que finalice el programa de PCR, siga las instrucciones del capítulo 2 y, específicamente, las secciones *Configuración de un experimento en el software Quantasoft™* y *Lectura de gotas*, de la Guía de aplicaciones de PCR *Droplet Digital™* disponible en la página web www.bio-rad.com para obtener los *Archivos resultantes de la lectura de la placa*. Como tipo de experimento, seleccione la opción ROJA: *detección de secuencia de objetivo rara (detección de eventos raros)*.

08 Análisis de resultados

Para la correcta interpretación de los resultados, es importante conocer el fluoróforo utilizado para marcar cada una de las dos dianas moleculares:

Sondas de hidrolisis	Fluoróforo
***F5* genotipo nativo (c.1601G)**	VIC™
***F5* genotipo mutado (c.1601A)**	FAM™

Tabla 7. Detalles sobre las sondas de hidrólisis

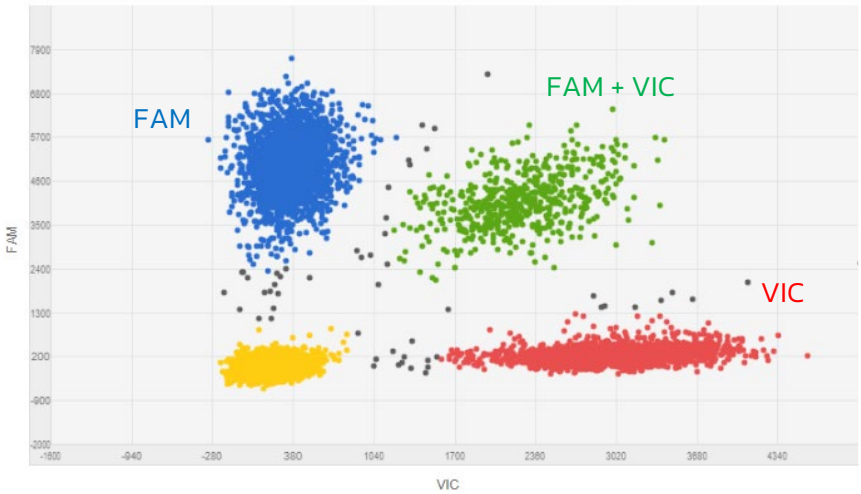

Figura 1. Representación gráfica de una muestra heterocigótica para la transición de G a A en la posición c.1601 del gen de la protrombina F5 (c.1601G> A)

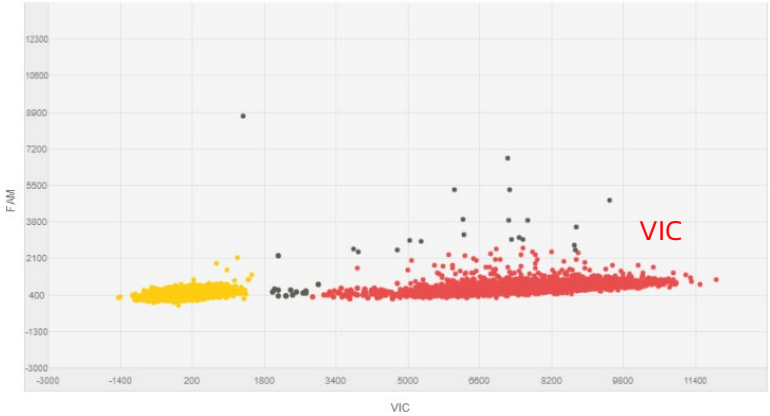

Figura 2. Representación gráfica de un gen homocigótico de protrombina F de genotipo nativo (c.1601G)

QuantStudio® 3D Digital PCR system (Thermo Fisher Scientific)

Los resultados del dPCR se analizan utilizando el software en línea *QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™* disponible en el sitio web de Thermo Fisher Scientific, www.thermofisher.com. Para acceder a él, el usuario primero debe registrarse antes de comenzar a usar la aplicación. Para obtener más detalles, siga las instrucciones en el capítulo 5 de la Guía del usuario del sistema de PCR digital 3D *QuantStudio™* MAN0007720. Una sección adicional sobre *Resolución de problemas* está disponible en la Guía del usuario.

Además, se deben tener en cuenta las siguientes pautas para un análisis correcto de los resultados:

- **Controles Negativos.** Confirme que no hay señales de amplificación para ninguno de los objetivos (FAM y VIC). Si se detecta amplificación, se debe realizar un análisis repetido para descartar la posibilidad de una contaminación accidental.
- Se recomienda revisar y, si es necesario, editar manualmente los resultados obtenidos para cada chip analizado accediendo a la pestaña "Revisar datos".
- Para el análisis de los resultados, acceda a "Revisar datos" para visualizar los resultados o la pestaña "Exportar" para exportar las copias / µL (FAM) del genotipo mutado y las copias / µL (VIC) del genotipo nativo para determinar la carga alélica en la muestra:

$$\%\ \boldsymbol{Zigosidad} = \frac{\frac{\boldsymbol{Copias}}{\mu\boldsymbol{L}}(\boldsymbol{FAM})}{\frac{\boldsymbol{Copias}}{\mu\boldsymbol{L}}(\boldsymbol{VIC}) + \frac{\boldsymbol{Copias}}{\mu\boldsymbol{L}}(\boldsymbol{FAM})}\ \boldsymbol{x\ 100}$$

  - Si ambos alelos de un organismo diploide son iguales, el organismo es homocigoto en ese locus. Si son diferentes, el organismo es heterocigoto en ese lugar:
    - 50% Zigosidad. *F5* Heterocigoto (c.1601G>A)
    - 100% Zigosidad. *F5* Homocigoto con genotipo mutante (c.1601A)
    - 0% Zigosidad. *F5* Homocigoto con genotipo nativo (c.1601G)

Droplet Digital™ PCR system (Bio-Rad)

El software *QuantaSoft™* de Bio-Rad se utiliza para el análisis de los resultados. Para facilitar la interpretación de los datos, siga las instrucciones del capítulo 2, específicamente los detalles incluidos en el *Análisis de datos* de la Guía de aplicaciones de PCR *Droplet Digital™*, disponible en el sitio web de BioRad www.bio-rad.com. Una sección adicional sobre *Resolución de problemas* está disponible en la Guía del usuario.

- Se recomienda revisar y, si es necesario, editar manualmente los resultados obtenidos para cada muestra.
- Para el análisis de los resultados, acceda a la pestaña "Analizar> Concentración" desde el software de análisis para calcular el porcentaje de quimerismo en la muestra:

$$\%\ \boldsymbol{Zigosidad} = \frac{\frac{\boldsymbol{Copias}}{\mu\boldsymbol{L}}(\boldsymbol{FAM})}{\frac{\boldsymbol{Copias}}{\mu\boldsymbol{L}}(\boldsymbol{VIC}) + \frac{\boldsymbol{Copias}}{\mu\boldsymbol{L}}(\boldsymbol{FAM})}\ \boldsymbol{x\ 100}$$

- Si ambos alelos de un organismo diploide son iguales, el organismo es homocigoto en ese locus. Si son diferentes, el organismo es heterocigoto en ese lugar:
  - 50% Zigosidad. *F5* Heterocigoto (c.1601G>A)
  - 100% Zigosidad. *F5* Homocigoto con genotipo mutante (c.1601A)
  - 0% Zigosidad. *F5* Homocigoto con genotipo nativo (c.1601G)

09 Troubleshooting

La siguiente tabla representa los resultados que podrían obtenerse utilizando los controles positivos y negativos y las muestras de ADNc. En caso de que se obtenga un resultado inesperado, la interpretación del resultado y la causa más probable de tal resultado se da en la tabla a continuación:

Control	*F5* Mutado	*F5* Nativo	Resultado / Interpretación
Control Positivo	+	+	Resultado esperado
	–	–	Fallo en la configuración de la PCR [1]
Muestra de ADN	–	+	Resultado esperado
	+	+	
	+	–	
	–	–	Error al amplificar la muestra de ADN [2]
Control Negativo	–	–	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la muestra con ADN humano [3]

Tabla 8. Interpretación de los posibles resultados obtenidos utilizando Imegen® Factor V dPCR

(1) Fallo en la configuración de la PCR: un error en la amplificación puede deberse a un problema técnico durante la configuración del sistema de PCR. Compruebe el programa de amplificación y la configuración de la detección de fluorescencia.

(2) Error al amplificar la muestra de ADN: un error al amplificar el gen *F5* en la muestra de DNAg podría sugerir que la cantidad o la calidad de la muestra de DNAg está comprometida. En esta situación, se recomendaría un segundo análisis antes de que se realice una interpretación de los resultados.

(3) Contaminación de la muestra con ADN de humano: la contaminación por PCR puede ser causada por un manejo inadecuado de la muestra, el uso de reactivos contaminados o por una contaminación ambiental. Para resolver este problema, se recomienda una limpieza a fondo del laboratorio donde se preparan los PCR, incluido el equipo y el material utilizado. Si es necesario, utilice alícuotas frescas de los reactivos de PCR.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

Imegen® Factor V dPCR ha sido validado utilizando los siguientes sistemas digitales de PCR:

- *QuantStudio® 3D Digital PCR system* (Thermo Fisher Scientific)

Si se va a utilizar un sistema de PCR digital diferente de los sistemas descritos en esta sección para la cuantificación de quimerismos moleculares con este kit, es posible que el programa de PCR deba reajustarse. En este caso, póngase en contacto con nuestro equipo de soporte técnico para obtener más detalles.

10.2 | Reactivos

Imegen® Factor V dPCR ha sido validado utilizando los reactivos incluidos en el kit y los reactivos recomendados por el proveedor de los sistemas dPCR, como se indica en la Sección 6 de este documento (Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran).

Se recomienda utilizar los reactivos dPCR proporcionados por el proveedor del termociclador. Por favor, contacte a nuestro equipo de Soporte Técnico si solicita más información.

10.3 | Estabilidad del producto

El funcionamiento analítico óptimo de este producto se confirma siempre que las condiciones de almacenamiento recomendadas se apliquen como se especifica en la Sección 5 (Contenido y condiciones de almacenamiento) desde la recepción del kit hasta la fecha de caducidad asignada a cada lote de producción.

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