Instrucciones de uso

Imegen® Huntington

Ref. IMG-154

CE IVD

Fabricado por:

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

healthincode.com

Código: HIC-PT-KIT 03-F-03 V.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.

Nuestros productos están diseñados para uso en 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 estos, 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® Huntington 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 09	ABR 2024	Cambio de control positivo a partir del lote 15424C012 y revisión del documento.
Versión 08	NOV 2023	Revisión y actualización del apartado "3. Características técnicas".
Versión 07	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 06	SEP 2022	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen S.L., a Health in Code S.L.
Versión 05	JUL 2020	Modificación del apartado 2, Uso previsto. Adición del apartado 3, características técnicas. Se añade en el apartado 5 Contenido y condiciones del kit, el control positivo.
Versión 04	JUL 2020	Actualización del apartado 7 Protocolo de ensayo y apartado 8 Análisis de resultados.

índice

01 **Información general** 4

02 **Uso previsto** 6

03 **Características técnicas** 7

04 **Advertencias y precauciones de seguridad** 8

05 **Contenido y condiciones de almacenamiento del kit** 9

06 **Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran** 10

07 **Protocolo de ensayo** 11

07.1 | Preparación de las reacciones de amplificación 11

07.2 | Preparación de los fragmentos amplificados 12

07.3 | Electroforesis capilar 12

08 **Análisis de los resultados** 14

09 **Troubleshooting** 20

10 **Limitaciones** 21

10.1 | Equipos 21

10.2 | Reactivos 21

10.3 | Estabilidad del producto 21

01 Información general

La enfermedad de Huntington (HD, OMIM #143100) es una enfermedad hereditaria que ocasiona la degeneración progresiva de las neuronas del cerebro. La enfermedad de Huntington tiene un amplio impacto en las capacidades funcionales de una persona y, generalmente, ocasiona trastornos del movimiento, pensamiento (cognitivos) y psiquiátricos.

La mayoría de las personas que padecen la enfermedad de Huntington presentan signos y síntomas entre los 35 y los 50 años. No obstante, la enfermedad puede aparecer antes o más adelante en la vida. Cuando la enfermedad se presenta antes de los 20 años, se la denomina «enfermedad de Huntington juvenil». El comienzo más temprano suele provocar un grupo de síntomas algo distintos y una progresión más rápida de la enfermedad.

La enfermedad de Huntington se hereda de forma autosómica dominante y es debida, en el 100% de los casos, a la expansión de la repetición del tri-nucleótido CAG del extremo 5′ del primer exón del gen de la huntingtina (HTT; MIM 613004), localizado en la región cromosómica 4p16.3.

El diagnóstico de la enfermedad de Huntington se establece en función del número de repeticiones del triplete CAG, considerando el genotipo normal un valor inferior a 26 repeticiones. Además, se ha establecido una relación inversamente proporcional entre el número de repeticiones y la edad al inicio de los síntomas. Esta relación es particularmente fuerte para repeticiones altas. La Tabla 1 indica el rango de repeticiones CAG en los alelos normales y mutantes.

Alelo	Repeticiones
Normal	**≤ 26 repeticiones CAG**
Intermedio	**27-35 repeticiones CAG**
Patológico	**≥ 36 repeticiones CAG**
Penetrancia reducida	36-39 repeticiones CAG
Penetrancia completa	≥ 40 repeticiones CAG

Tabla 1. Información de las expansiones analizadas en el Imegen® Huntington. (Actualizado el 16/04/2024).

Referencias

- *Jama M, Millson A, Miller CE, Lyon E. Triplet repeat primed PCR simplifies testing for Huntington disease. J Mol Diagnóstico. 2013; 15: 255–62.*
- *Lora Bean, Pinar Bayrak-Toydemir. American College of Medical Genetics and Genomics Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories, 2014 edition: technical standards and guidelines for Huntington disease. Genet Med. 2014 Dec;16(12).*

- *Kay C, Collins JA, Miedzybrodzka Z, Madore SJ, Gordon ES, Gerry N, Davidson M, Slama RA, Hayden MR. Huntington disease reduced penetrance alleles occur at high frequency in the general population. Neurology. 2016; 87: 282–8.*
- *Technical standards and guidelines for Huntington disease testing. Potter NT, Spector EB, Prior TW. Genet Med. 2004 Jan-Feb;6(1):61-5.*
- *Losekoot M1, van Belzen MJ, Seneca S, Bauer P, Stenhouse SA, Barton DE (2013) EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. European Molecular Genetic Quality Network (EMQN). Eur J Hum Genet. 21(5):480-486*

02 Uso previsto

Imegen® Huntington permite el análisis de la expansión CAG del extremo 5′ del primer exón del gen HTT mediante dos PCRs (PCR corta y PCR larga). En la PCR corta (HTT-C) se amplifica únicamente el fragmento poli-CAG causante de la enfermedad, mientras que mediante la PCR larga (HTT-L) se amplifica el fragmento poli-CAG y un fragmento polimórfico poli-CCG adyacente.

Es necesario evaluar los resultados de la HTT-L PCR en aquellas muestras donde solo se haya detectado un alelo mediante el uso de la PCR corta (HTT-C) ya que esto puede deberse a una pérdida alélica asociada a la presencia de un polimorfismo en la zona de unión de uno de los cebadores de la PCR corta (HTT-C) o a que la muestra sea homocigota. La PCR larga (HTT-L) amplifica de forma simultánea el fragmento poli-CAG y el polimorfismo-CCG que puede variar entre 7 y 11 repeticiones.

Los productos de PCR marcados con 6-Carboxifluoresceina (6-FAM) y NED™ se separan mediante electroforesis capilar para analizar el tamaño de los amplicones.

Imegen® Huntington es sólo para uso diagnóstico *in vitro* y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

03 Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando muestras objeto de análisis del interlaboratorio de EMQN *(European Molecular Genetics Quality Network)*, así como muestras analizadas previamente por el servicio de genética médica de Health in Code S.L. y permite detectar específicamente las expansiones objeto de análisis de este kit.

El material necesario para este estudio es ADN genómico procedente, principalmente, de sangre periférica. La cantidad total de ADN necesario es 25 ng para cada sistema de amplificación.

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 la realización de 12 determinaciones.
La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- ***Huntington Master Mix***: *buffer* de amplificación con dNTPs, $MgCl_2$ y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- ***HTT-L Master Mix***: oligonucleótidos específicos marcados con el fluoróforo NED™ para llevar a cabo la reacción de amplificación de la PCR larga, incluye el fragmento poli-CAG y el fragmento polimórfico poli-CCG adyacente.
- ***HTT-C Master Mix***: oligonucleótidos específicos marcados con el fluoróforo 6-FAM para llevar a cabo la reacción de amplificación de la PCR corta, incluye el fragmento poli-CAG.
- ***General Master Mix IV***: polimerasa de ADN necesaria para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- ***Positive Control***: ADN sintético en el que se encuentra presente un alelo normal de 16 repeticiones y otro expandido con 64 repeticiones del fragmento poli-CAG a una concentración óptima de amplificación.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
Huntington Master Mix	Disco amarillo	460 µl	-20°C
HTT-L Master Mix	Disco verde	66 µl	-20°C
HTT-C Master Mix	Disco morado	66 µl	-20°C
General Master Mix IV	Tapa amarilla	10 µl	-20°C
Positive Control	Tapa negra	40 µl	-20°C

Tabla 2. Componentes del kit Imegen® Huntington.

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador convencional
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL
- *Vortex*
- Centrífuga
- Equipo de electroforesis capilar

Reactivos:

- *GeneScan™ 500 LIZ®* (Applied Biosystems cat. no. 4322682)
- *Hi-Di™ formamide*
- Agua libre de nucleasas

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL)
- Tubos estériles de 1.5 mL.
- Tubos de 0.2 mL
- Placas de 96 pocillos compatibles con el equipo de electroforesis capilar
- *Film* para placas de 96 pocillos
- Guantes de látex

NOTA: Este kit no incluye los reactivos necesarios para llevar a cabo la electroforesis capilar.

Kits complementarios

Para el análisis de expansiones implicadas en otras enfermedades neurodegenerativas, Health in Code S.L. también ofrece los kits:

- Imegen® DM1 (ref IMG-173)
- Imegen® SBMA (ref IMG-153)
- Imegen® SCAs (ref IMG-152)
- Imegen® Friedreich (ref IMG-155)

Todos ellos, junto con el kit Imegen® Huntington, han sido validados utilizando el mismo programa de PCR a tiempo real, por lo que se pueden analizar conjuntamente.

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de las reacciones de amplificación

El kit Imegen® Huntington está diseñado para realizar dos reacciones de PCR por cada muestra que se desea analizar.

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se recomienda tener en cuenta el número total de muestras y controles a analizar simultáneamente e incrementar un 10% adicional del volumen de cada reactivo.

A continuación, se muestra el protocolo recomendado para la preparación de las reacciones de amplificación:

01 Descongelar todos los reactivos y el ADN de las muestras. Agitar cada uno de los reactivos en *vortex* y mantener en frío.

02 En un tubo de 1.5 mL preparar el *mix* de la PCR corta (HTT-C).

Reactivos	Cantidad por reacción
Huntington Master Mix	17,3 µL
General Master Mix IV	0,2 µL
HTT-C Master Mix	5 µL

03 En un tubo de 1.5 mL, preparar el *mix* de la PCR larga (HTT-L):

Reactivos	Cantidad por reacción
Huntington Master Mix	17,3 µL
General Master Mix IV	0,2 µL
HTT-L Master Mix	5 µL

04 Agitar en *vortex* y dar *spin* a los *mixes* de HTT-C y HTT-L.

05 Dispensar 22.5 µL a los correspondientes tubos de 0.2 mL y añadir 2.5 µL de las muestras diluidas a una concentración de 10 ng/µL.

NOTA: Se recomienda incluir un control negativo de PCR por cada tanda de amplificación para confirmar la ausencia de contaminación y también controles positivos para verificar el tamaño de los alelos. Ante la posibilidad de no tener controles positivos, el kit incluye un control positivo con 26 repeticiones a la concentración de uso.

06 Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de amplificación:

Campos	Etapa 1 Activación enzimática	Etapa 2 HTT-C y HTT-L PCR			Etapa 3	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	30 ciclos			1 ciclo	
		Desnaturalización	Unión de cebadores	Extensión	Finalización de la PCR y conservación	
Temperatura	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	5 minutos	1 minuto	1 minuto	2 minutos	10 minutos	∞

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para los equipos T3 de Biometra, SimpliAmp Thermal Cycler y GENEAMP® PCR System 2720 de Applied Biosystems.

↘ Es posible detener el protocolo en este punto. Los productos de PCR pueden almacenarse a 4 °C si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas o a -20 °C para periodos de tiempo superiores.

07.2 | Preparación de los fragmentos amplificados

A partir de los productos de las PCRs HTT-C y HTT-L, preparar la placa para el análisis de fragmentos como se indica a continuación:

01 Añadir a un tubo de 1.5 mL los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad por reacción
Formamida	18 µL
Marcador GeneScan™ 500 LIZ	0.5 µL

Recomendamos realizar los cálculos considerando una reacción más, o bien, incrementando en un 10% el volumen de cada reactivo.

NOTA: El volumen del marcador de tamaño puede ser aumentado o disminuido para ajustar la intensidad de los picos.

02 Dispensar 18.5 µL de la mezcla anterior en cada pocillo.

03 Añadir 1 µL del ADN obtenido en cada reacción de PCR.

NOTA: El volumen de muestra puede ser aumentado o disminuido (diluyendo las muestras) para ajustar la intensidad de los picos.

04 Tapar la placa, dar un spin y desnaturalizar en un termociclador durante 5 minutos a 98°C.

05 Guardar a 4°C la placa hasta el momento de introducirla en el secuenciador.

07.3 | Electroforesis capilar

Una vez preparada la placa de fragmentos, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Dependiendo del modelo de secuenciador utilizado, se emplearán las condiciones de electroforesis recomendadas por el fabricante.

Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que el rango de amplificación varía aproximadamente entre 100-500 pb, que se emplean cebadores marcados con 6-FAM y NED™ que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScan™ 500 LIZ.

A continuación, se muestra una imagen con las condiciones optimizadas para el secuenciador 3730xl DNA Analyzer (*Thermo Fisher Scientific*), usando el polímero POP-7™.

Run Module Settings

Name	Value	Range
Oven_Temperature	63	18...70 DegC
Buffer_Temperature	35	30...35 DegC
PreRun_Voltage	15.0	0...15 kV
PreRun_Time	180	1...1800 sec
Injection_Voltage	1.6	0...15 kV
Injection_Time	15	1...90 sec
First_ReadOut_Time	200	100...16000 ms
Second_ReadOut_Time	200	100...16000 ms
Run_Voltage	8.0	0...15 kV
Voltage_Number_Of_Steps	10	0...100 Steps
Voltage_Step_Interval	20	0...180 secs
Voltage_Tolerance	0.6	0...6.0 kV
Current_Stability	30.0	0...2000 uA
Ramp_Delay	1	1...1800 sec
Data_Delay	350	1...1800 sec
Run_Time	7000	300...14000 sec

Ok Cancel

Figura 1. Parámetros optimizados para el secuenciador 3730xl DNA.

La intensidad de la detección puede variar entre los distintos equipos, dependiendo del modelo, del estado del sistema óptico del equipo y del tiempo y voltaje de inyección. Por ello, puede ser necesario, aumentar o disminuir la cantidad de marcador de tamaño o de producto de PCR requeridos para llevar a cabo la electroforesis capilar.

08 Análisis de los resultados

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

- Para analizar las muestras hay que emplear un *software* específico y el fichero .fsa obtenido como resultado de la electroforesis capilar.
- Comprobar la ausencia de picos en el control negativo de PCR. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el ensayo para descartar que se haya producido una contaminación accidental.
- Análisis de las muestras:

  La PCR corta (HTT-C) permite detectar >100 repeticiones del fragmento poli-CAG. Se pueden obtener los siguientes resultados:

  > Muestra heterocigota para la repetición CAG: se observan dos picos en la HTT-C y se calcula en número de repeticiones CAG a partir de los tamaños de fragmentos obtenidos.

  > Muestra homocigota para la repetición CAG: se observa un pico en la HTT-C. En este caso es necesario confirmar el resultado con la PCR larga (HTT-L), ya que también existe la posibilidad de pérdida alélica.

  En la PCR larga (HTT-L) la región de amplificación es mayor e incluye una zona repetitiva del fragmento poli-CCG, adyacente a las repeticiones del fragmento poli-CAG. El número de repeticiones de CCGs puede variar entre 7 y 11, y no tiene implicación clínica en la enfermedad de Huntington.

  En el caso donde solo se observa un pico en la HTT-C se pueden obtener los siguientes resultados en la HTT-L:

  > Confirmación de que la muestra es homocigota para la repetición CAG: se observan dos picos, ya que cada alelo tiene un número de repeticiones del fragmento poli-CCG diferente (pudiendo variar entre 7 y 11 repeticiones), pero el número de repeticiones del fragmento poli-CAG es el mismo.

  > Confirmación de pérdida alélica: se observan dos picos, ya que cada alelo tiene un número de repeticiones del fragmento poli-CCG diferente, pero se ha perdido uno de los alelos en la HTT-C. La muestra es heterocigota con un número conocido de CAG para el alelo detectado en la HTT-C, y se podría calcular un valor aproximado para el alelo detectado en la HTT-L.

  > No se puede confirmar el resultado: Si solo se observa un pico puede ser debido a que el número de repeticiones CCG es el mismo en ambos alelos por lo que no se puede confirmar ni la homocigosis ni la pérdida alélica.

Cálculo del número de repeticiones del fragmento poli-CAG

HTT-C Master Mix

Para calcular el número de repeticiones de CAG en la PCR corta (HTT-C) se puede utilizar una muestra control o el control positivo del kit, ya que tiene un número de repeticiones conocido: un alelo normal de 16 repeticiones y un alelo de aproximadamente 64 repeticiones (ver figura 2). Esta forma de interpretación es la recomendada por Health in Code, S.L. puesto que minimiza las posibles variaciones entre diferentes ensayos y laboratorios.

$$Nº\ repeticiones\ CAG = \frac{Tamaño_{Alelo\ x} - Tamaño_{Alelo\ control}}{3} + nº\ rep\ alelo\ control$$

Siendo:

- **Tamaño alelo X**: tamaño (pb) del pico obtenido de la muestra analizada.
- **Tamaño del alelo control**: tamaño (pb) del pico obtenido del control positivo.
- **Nº rep alelo control**: el número de repeticiones del alelo seleccionado del control positivo.

NOTA: Pueden tener lugar variaciones ± 1 CAG repetición. Esto se debe a variaciones en los reactivos utilizados o al equipo de electroforesis capilar empleado para el análisis de fragmentos.

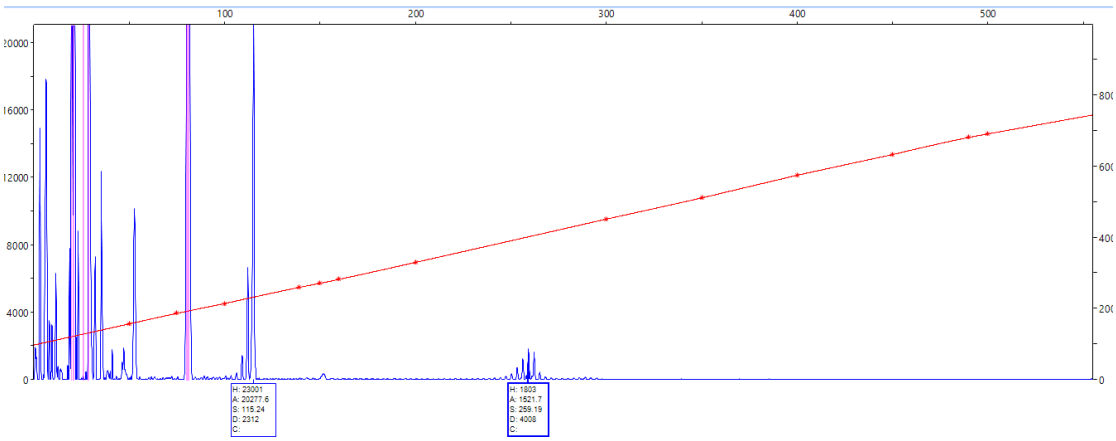

Figura 2. Control positivo con un alelo normal (16 CAGs) y un alelo expandido (64 CAGs) para el sistema HTT-C.

Tamaño Alelos (pb)		Nº rep CAG	
		Alelo 1	Alelo 2
115	259	16	64

Tabla 4. Nº repeticiones del control positivo con un alelo normal y otro expandido, para el sistema HTT-C.

Para analizar una muestra (figura 3) con el sistema HTT-C se aplica la fórmula anterior, y los valores del tamaño obtenidos del control positivo cargado en el mismo ensayo

(Tabla 4 y 5). Se recomienda utilizar los valores del alelo normal de 16 repeticiones, ya que es más estable y de mayor intensidad de fluorescencia, lo cual facilitará la interpretación.

A continuación, se observa el electroferograma correspondiente a una muestra cargada con el sistema HTT-C.

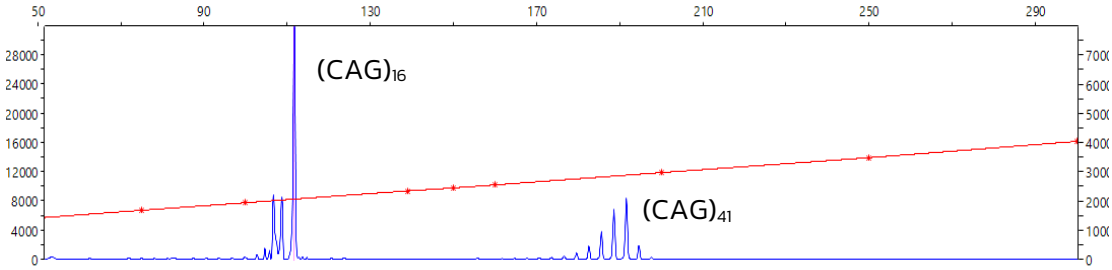

Figura 3. Muestra con un alelo normal (16 CAGs) y un alelo expandido (41 CAGs) para el sistema HTT-C.

Tamaño Alelos X		Tamaño Alelo Control	Nº rep CAG	
			Alelo 1	Alelo 2
115	191	115	16	41

Tabla 5. Nº de repeticiones de una muestra con un alelo normal y otro expandido, para el sistema HTT-C.

$$Nº\ repeticiones\ (CAG)\ Alelo\ 1 = \frac{115 - 115}{3} + 16 = 16$$

$$Nº\ repeticiones\ (CAG)\ Alelo\ 2 = \frac{191 - 115}{3} + 16 = 41$$

Otra forma de calcular el número de repeticiones (CAG) en ausencia de una muestra control o del control positivo, es teniendo en cuenta el tamaño del producto de PCR obtenido con el sistema de amplificación, aplicando la siguiente fórmula.

$$Nº\ repeticiones\ (CAG) = \frac{Tamaño_{Alelo\ x} - 68\ pb}{3}$$

Siendo:

- **El valor "68"**: el tamaño del amplicón del alelo de referencia, confirmado tanto *in silico*, como en nuestros laboratorios durante la validación del kit.
- **Tamaño alelo X**: tamaño (pb) del pico obtenido de la muestra analizada.

Por ejemplo, para la muestra de la figura 3, con un alelo normal y un alelo expandido, aplicando la fórmula anterior se obtienen los siguientes resultados.

$$Nº\ repeticiones\ (CAG)\ Alelo\ 1 = \frac{115 - 68}{3} = 16$$

$$Nº\ repeticiones\ (CAG)\ Alelo\ 2 = \frac{191 - 68}{3} = 41$$

Cálculo del número de repeticiones del fragmento poli-CCG

HTT-L (Long) Master Mix

La siguiente fórmula se utiliza para calcular el número de repeticiones de (GAC + CCG) para el posterior cálculo del número de repeticiones de CCG. Para ello se recomienda utilizar una muestra control o el control positivo del kit (figura 4).

Esta forma de interpretación es la recomendada por Health in Code, S.L. puesto que minimiza las posibles variaciones entre diferentes ensayos y laboratorios:

$$Nº\ repeticiones\ GAC + CCG = \frac{Tamaño_{Alelo\ x} - Tamaño_{Alelo\ control}}{3} + n^{\underline{o}}\ rep\ alelo\ control$$

Siendo:

- **Tamaño alelo X**: tamaño (pb) del pico obtenido de la muestra analizada.
- **Tamaño del alelo control**: tamaño (pb) del pico obtenido del control positivo.
- **Nº rep alelo control**: el número de repeticiones del alelo seleccionado del control positivo.

NOTA: Pueden tener lugar variaciones ± 1 CCG + CAG repeticiones. Esto se debe a variaciones en los reactivos utilizados o al equipo de electroforesis capilar empleado para el análisis de fragmentos.

$$Nº\ repeticiones\ (CCG) = Nº\ repeticiones\ (CAG + CCG) - Nº\ repeticiones\ (CAG)$$

Siendo:

- **Nº rep (CAG+CCG)**: el número de repeticiones de uno de los dos alelos obtenido en la fórmula anterior.
- **Nº rep (CAG)**: el número de repeticiones calculado en la PCR corta para el mismo alelo.

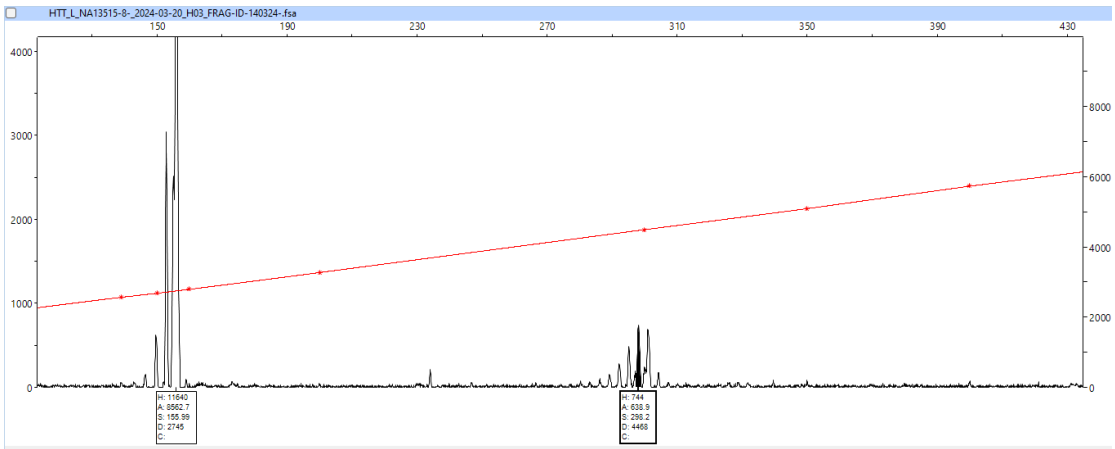

Figura 4. Control positivo con un alelo normal (24 CAG + CCG) y un alelo expandido (72 CAG + CCG) para el sistema HTT-L.

Tamaño Alelos (pb)		Nº rep (CAG + CCG)		Nº rep (CCG)	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
156	298	24	72	9	8

Tabla 6. Nº de repeticiones del control positivo con un alelo normal y otro expandido, para el sistema HTT-L.

Para analizar una muestra con el sistema HTT-L (Figura 5) se aplica la fórmula anterior, y los valores del tamaño (pb) del control positivo cargado en el mismo ensayo (Tabla 6 y 7). Se recomienda utilizar los valores del alelo normal de 24 repeticiones (GAC + CCG), ya que es más estable y de mayor intensidad de fluorescencia, lo cual facilitará la interpretación.

A continuación, se observa el electroferograma correspondiente a una muestra cargada con el sistema HTT-L.

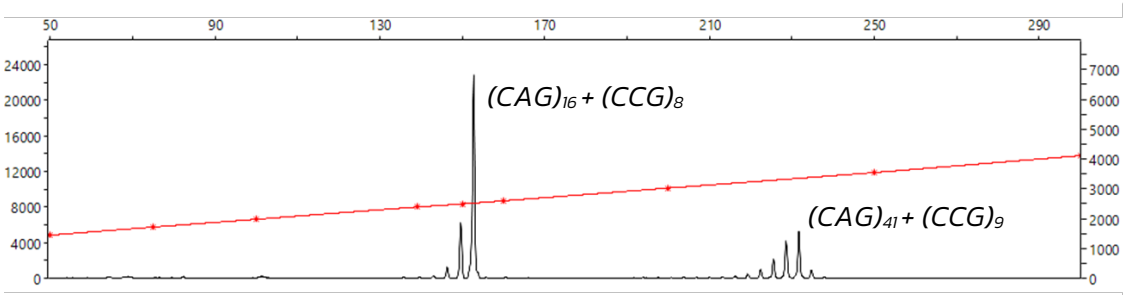

Figura 5. Muestra con un alelo normal (16 CAGs) y un alelo expandido (41 CAGs) para el sistema HTT-L

Tamaño Alelos X		Tamaño Alelo Control	Nº rep (GAC + CCG)		Nº rep (CCG)	
			Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
155	235	156	24	50	8	9

Tabla 7. Número de repeticiones (CAG + CCG) y (CCG) de una muestra con un alelo normal y otro expandido utilizando el control positivo del kit.

$$Nº\ repeticiones\ (CAG + CCG)\ Alelo\ 1 = \frac{155 - 156}{3} + 24 = 24$$

$$Nº\ repeticiones\ (CAG + CCG)\ Alelo\ 2 = \frac{235 - 156}{3} + 24 = 50$$

$$Nº\ repeticiones\ (CCG)\ Alelo\ 1 = 24 - 16 = 8$$

$$Nº\ repeticiones\ (CCG)\ Alelo\ 2 = 50 - 41 = 9$$

El número de repeticiones de CCG para el alelo 1 y el alelo 2 de la muestra analizada está entre las 7 y 11 repeticiones de CCG esperadas.

Otra forma de calcular el número de repeticiones (CAG + CCG) en ausencia de una muestra control o del control positivo, es teniendo en cuenta el tamaño del producto de PCR obtenido con el sistema de amplificación, aplicando la siguiente fórmula.

$$Nº\ repeticiones\ (CAG + CCG) = \frac{Tamaño_{Alelo\ x} - 86\ pb}{3}$$

Siendo:

- **El valor "86"**: el tamaño del amplicón del alelo de referencia, confirmado tanto *in silico*, como en nuestros laboratorios durante la validación del kit.
- **Tamaño alelo X**: tamaño (pb) del pico obtenido de la muestra analizada.

Por ejemplo, para la muestra de la Figura 5, con un alelo normal y un alelo expandido, aplicando la fórmula anterior se obtienen los siguientes resultados:

$$Nº\ repeticiones\ (CCG + CAG)\ Alelo\ 1 = \frac{155 - 86}{3} = 23$$

$$Nº\ repeticiones\ (CCG + CAG)\ Alelo\ 2 = \frac{235 - 86}{3} = 50$$

09 Troubleshooting

La siguiente tabla representa los resultados que podrían obtenerse en las muestras analizadas, el control positivo, el marcador de tamaño y el control negativo, así como la interpretación y la razón más probable en caso de obtener un resultado inesperado:

Problema	Muestras analizadas	Positive control	Marcador de tamaño	Control negativo	Resultados / Interpretación
Señal de fluorescencia débil o nula				✔	Resultado esperado
	✔			✔	Cantidad y/o calidad del ADN molde insuficiente [1] ADN molde impuro [2]
	✔	✔	✔	✔	Fallo en la electroforesis capilar [3] Fallo en la desnaturalización [4]
	✔	✔		✔	Fallo en la PCR [5]
Señal de fluorescencia excesiva	✔				Cantidad excesiva de ADN [6]
	✔	✔			
Presencia de más picos de los esperados	✔	✔		✔	Contaminación [7]
	✔				Contaminación [7]
	✔	✔			Artefactos característicos de las expansiones [8]

Tabla 4. Interpretación de los posibles resultados con el kit Imegen® Huntington

(1) Cantidad y/o calidad de ADN molde insuficiente: Comprobar que el ADN ha sido correctamente cuantificado y usar la cantidad indicada de ADN molde. En caso de que el ADN haya sido correctamente cuantificado, comprobar su integridad y llevar a cabo una nueva extracción si es necesario.

(2) ADN molde impuro: Altas concentraciones de sales o un pH alterado pueden inhibir la PCR. Si usa un ADN molde disuelto en un tampón de elución con un pH diferente de 8 o con concentraciones altas de EDTA, el volumen de ADN no debería exceder el 20% del volumen total de la reacción. Restos de los reactivos usados durante la extracción también pueden afectar a la reacción de PCR. Si es así, limpie el ADN o prepare una nueva extracción.

(3) Fallo en la electroforesis capilar: Revise si los parámetros del equipo son los especificados y reinyecte las muestras.

(4) Fallo en la desnaturalización: Para una correcta desnaturalización las muestras deben ser calentadas el tiempo indicado en el apartado 7 de este documento, y posteriormente mantener en frio hasta la carga en el secuenciador.

(5) Fallo en la PCR: Compruebe que el programa de PCR es el indicado.

(6) Cantidad excesiva de ADN: Asegúrese de estar usando la cantidad adecuada de ADN. Si es así, diluya el producto de PCR en agua estéril desionizada y prepare de nuevo la desnaturalización y carga en el secuenciador.

(7) Contaminación: Puede ser producida por otro ADN molde o por un ADN previamente amplificado. La contaminación cruzada puede dar lugar a falsos positivos y negativos, derivando todo ello en problemas en la interpretación de los resultados. Use puntas de pipeta con filtro y cambie los guantes regularmente.

(8) Artefactos característicos de las expansiones: La amplificación de expansiones genera artefactos que aparecen como picos más pequeños, y alejados 3 pares de bases del pico predominante.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

Imegen® Huntington ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- *SimpliAmp Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific)
- *GeneAmp PCR System 2720* (Thermo Fisher Scientific)
- *T3000 Thermocycler 48* (Biometra)

Si usa otra marca o modelo de termocicladores, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro soporte técnico para cualquier consulta o aclaración.

Imegen® Huntington ha sido validado usando la siguiente plataforma de secuenciación:

- *3730xl DNA Analyzer* (Thermo Fisher Scientific)

Este kit es válido para los polímeros compatibles con el marcaje 6-Carboxifluoresceina (6-FAM) y NED™. En caso de utilizar otro equipo diferente al mencionado anteriormente, seguir las especificaciones del protocolo de dichas plataformas.

10.2 | Reactivos

Imegen® Huntington se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este documento (Equipos y materiales necesarios que no se suministran).

Para la electroforesis capilar se recomienda emplear los reactivos recomendados por el proveedor del secuenciador: Thermo Fisher Scientific.

En caso de duda, por favor contacte con nuestro servicio 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.

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