Instrucciones de uso

Imegen® Friedreich

Ref. IMG-155

RUO

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.01

healthincode

Health in Code, S.L. le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

Este producto está diseñado para uso en investigación. 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. Imegen® Friedreich ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

+34 963 212 340

tech.support@healthincode.com

Imegen® *es una marca registrada de Health in Code, S.L. en España.*

Modificaciones de las instrucciones de uso (IFU)		
Versión 08	NOV 2023	Revisión y actualización del apartado "3. Características técnicas".
Versión 07	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 06	SEP 2022	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a HEALTH IN CODE, S.L.
Versión 05	JUL 2021	Corrección cantidad ADN de partida apartado 2
Versión 04	ABR 2021	Actualización apartados 5 y 8
Versión 03	ENE 2021	Modificación de los controles positivos. Los controles constituyen muestras de ADN genómico. Cambio aplica a partir del lote 11020A051
Versión 02	DIC 2019	Revisión de contenido. Actualización ISO 9001

índice

01 **Información general** 4

02 **Uso previsto** 5

03 **Advertencias y precauciones de seguridad** 6

04 **Contenido y condiciones de almacenamiento del kit** 7

05 **Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran** 8

06 **Protocolo de ensayo** 9

06.1 | Preparación de las reacciones de amplificación 9

06.2 | Preparación de los fragmentos amplificados 10

06.3 | Electroforesis capilar 10

07 **Análisis de los resultados** 12

07.1 | Resultados TP-PCR 12

08 **Troubleshooting** 14

09 **Limitaciones** 15

09.1 | Equipos 15

09.2 | Reactivos 15

09.3 | Estabilidad del producto 15

01 Información general

La ataxia de Friedreich (FRDA; MIM#229300) es la ataxia hereditaria más frecuente, afecta aproximadamente a 1 de cada 29.000 individuos. Se hereda siguiendo un patrón autosómico recesivo, y en la mayoría de los pacientes (98%) es debida a la expansión en homocigosis de la repetición del tri-nucleótido GAA del intrón 1 del gen *FRATAXINA* (FXN o X25; MIM*606829), localizado en la región cromosómica 9q13.

Las características clínicas distintivas de la ataxia de Friedreich incluyen ataxia aferente y cerebelosa progresiva, disartria, alteración del sentido de vibración y propiocepción, ausencia de reflejos tendinosos en los miembros inferiores, debilidad piramidal, escoliosis, deformidad del pie y cardiomiopatía.

La detección de la ataxia de Friedreich se lleva a cabo mediante la identificación del número de repeticiones GAA, estableciéndose el genotipo normal en menos de 33 repeticiones. La Tabla 1 muestra el rango de repeticiones GAA en los alelos normales y mutados.

Alelo	Repeticiones
Normal	< 33 repeticiones GAA
Pre-mutado	34-65 repeticiones GAA
Patológico	66-1300 repeticiones GAA

Tabla 1. Información de las expansiones analizadas en el kit Imegen® Friedreich.

Referencias

> *Consensus clinical management guidelines for Friedreich ataxia. Louise A Corben, David Lynch, Massimo Pandolfo, Jörg B Schulz, Martin B Delatycki, On behalf of the Clinical Management Guidelines Writing Group. Orphanet J Rare Dis. 2014; 9: 184. Published online 2014 Nov 30. doi: 10.1186/s13023-014-0184-7*

02 Uso previsto

Mediante el uso del kit Imegen® Friedreich se puede analizar la expansión GAA del intrón 1 del gen *FRATAXINA* (FXN o X25; MIM*606829) mediante PCR y posterior electroforesis capilar. Además, el kit ofrece un sistema de TP-PCR *(triplet repeat primed PCR)*, para los casos con expansiones de mayor tamaño, no detectables por PCR convencional.

El ensayo de TP-PCR emplea un oligonucleótido marcado específico de locus que flanquea la repetición, junto con oligonucleótidos emparejados que amplifican desde múltiples sitios de la expansión, permitiendo por PCR a tiempo final y posterior electroforesis capilar, la detección de los alelos expandidos no detectables por la PCR convencional.

Los productos de PCR serán separados por electroforesis capilar, y tanto la PCR como la TP-PCR serán detectados mediante el marcaje 6-Carboxifluoresceina (6-FAM).

Imegen® Friedreich está dirigido a la detección de la Ataxia de Friedreich.

Este kit ha sido validado utilizando muestras de ADN de la Unidad de Genética Médica de Health in Code S.L., previamente genotipadas mediante el uso de otras tecnologías.

Imegen® Friedreich es sólo para uso en investigación y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

03 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.

04 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:

- ***Friedreich Master Mix A**: Master Mix* de PCR con las cantidades de nucleótidos, $MgCl_2$ y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- ***Friedreich Master Mix B**: Master Mix* de TP-PCR con las cantidades de nucleótidos, $MgCl_2$ y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- ***PCR Master Mix**: Master Mix* con los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la amplificación por PCR de la región diana del kit.
- ***TP-PCR Master Mix**: Master Mix* con los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la TP-PCR *(triplet repeat primed PCR)*.
- ***Friedreich Taq**:* DNA polimerasa necesaria para llevar a cabo las reacciones de amplificación de la PCR.
- ***General Master Mix IV**: Master Mix* de PCR con las cantidades de enzima y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación de la TP-PCR.

Tabla 2. Componentes del kit Imegen® Friedreich.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
Friedreich Master Mix A	Disco blanco	205 µl	-20°C
Friedreich Master Mix B	Disco amarillo	208 µl	-20°C
PCR Master Mix	Disco rojo	60 µl	-20°C
TP-PCR Master Mix	Disco azul	60 µl	-20°C
Fiedreich Taq	Tapa naranja	6 µl	-20°C
General Master Mix IV	Tapa amarilla	5 µl	-20°C

05 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL
- *Vortex*
- Centrífuga
- Secuenciador

Reactivos:

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

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL)
- Tubos estériles de 1.5 mL.
- Tubos o placas de 96 pocillos de 0.2 mL
- 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® SCAs (Ref: IMG-152), Imegen® SBMA (Ref. IMG-153), Imegen® Huntington (Ref. IMG-154), Imegen® DM1 (Ref. IMG-173). Todos ellos junto con el kit Imegen® Friedreich, han sido diseñados usando el mismo programa de PCR, por lo que se pueden analizar conjuntamente.

06 Protocolo de ensayo

06.1 | Preparación de las reacciones de amplificación

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

Se prepararán dos mezclas de PCR distintas por muestra, una para la reacción de PCR y otra para la TP-PCR. A continuación, se muestra el protocolo recomendado para la preparación de las reacciones de amplificación:

01 Descongelar todos los reactivos del kit 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 PCR añadiendo los siguientes reactivos.

Reactivos	Cantidad por reacción
Friedreich Master Mix A	17 µL
Friedreich Taq	0,5 µL
PCR Master Mix	5 µL

03 En un tubo de 1.5 mL, preparar el *mix* para la TP-PCR añadiendo los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad por reacción
Friedreich Master Mix B	17,3 µL
General Master Mix IV	0,2 µL
TP-PCR Master Mix	5 µL

04 Agitar en *vortex* y dar *spin* a los mixes de PCR y TP-PCR. Dispensar 22.5 µL a los correspondientes tubos de 0.2 mL.

05 Añadir 2.5 µL de las muestras diluidas a una concentración de 10 ng/µL. Es conveniente poner un control negativo de PCR y TP-PCR por cada tanda de amplificación para comprobar la ausencia de contaminación de los reactivos, y también controles positivos de genotipo conocido para verificar el tamaño de los alelos.

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

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

Campos	Etapa 1 Activación enzimática	Etapa 2 PCR o TP-PCR			Etapa 3	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	30 ciclos			1 ciclo	
		Desnaturalización	Unión de cebadores	Extensión	Finalización de la PCR o TP-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	∞

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.

06.2 | Preparación de los fragmentos amplificados

A partir de los productos de PCR y TP-PCR, 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 las reacciones de PCR y TP-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.

06.3 | 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 200 y 500 pb, que se emplean cebadores marcados con 6-FAM y 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.

07 Análisis de los resultados

Una vez con los resultados en el software de análisis, para calcular el número exacto de repeticiones de un alelo desconocido se puede emplear la siguiente formula:

$$Nº\ repeticiones = \frac{Tamaño_{Alelo\ x}\ (pb) - 244}{3}$$

NOTA: El valor 244 de la fórmula procede de una conversión del tamaño de amplicón obtenido con los oligonucleótidos diseñados para este kit, comprobado tanto in sílico, como en nuestros laboratorios durante la validación del kit.

Debido a las variaciones descritas de una repetición entre distintos laboratorios, desde Health in Code, S.L. recomendamos el uso de una muestra con una repetición de tamaño conocido, y usando la siguiente fórmula (Ejemplo: 36 repeticiones):

$$Nº\ repeticiones = \frac{Tamaño_{Alelo\ x}\ (pb) - Tamaño_{Alelo\ conocido\ 36}}{3} + 36$$

A continuación, se muestran imágenes de diferentes perfiles genéticos de expansión en GAA:

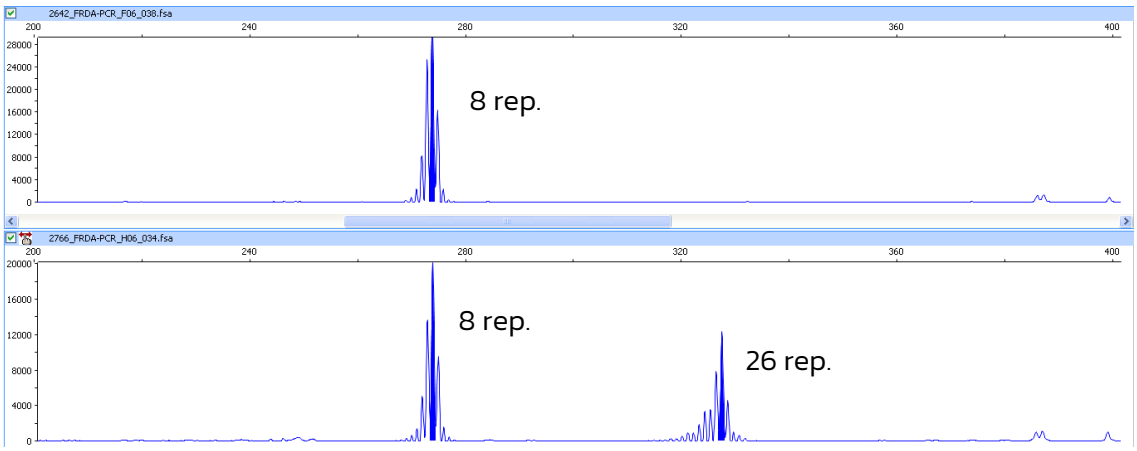

Figura 2. Ejemplos de resultados obtenidos con el mix de PCR del kit imagen© Friedreich.

07.1 | Resultados TP-PCR

En aquellas muestras donde sólo se haya detectado un alelo mediante el uso del sistema de PCR, el genotipo de la muestra podría ser homocigoto para ese alelo o heterocigoto, con un alelo normal, y un alelo expandido, no detectable por PCR convencional.

Para poder diferenciar entre muestras homocigotas y heterocigotas con un alelo expandido no detectable por PCR convencional, ha sido diseñado el sistema de TP-PCR *(Triplet Repeat primed Polymerase Chain Reaction)* del kit Imegen® Friedreich.

Al tratarse de una PCR en la que se emplea un oligonucleótido marcado específico de locus, y oligonucleótidos emparejados que amplifican en cualquier punto de la expansión, mediante esta técnica se podrán detectar expansiones de cualquier tamaño, aunque no permite la determinación del número de repeticiones.

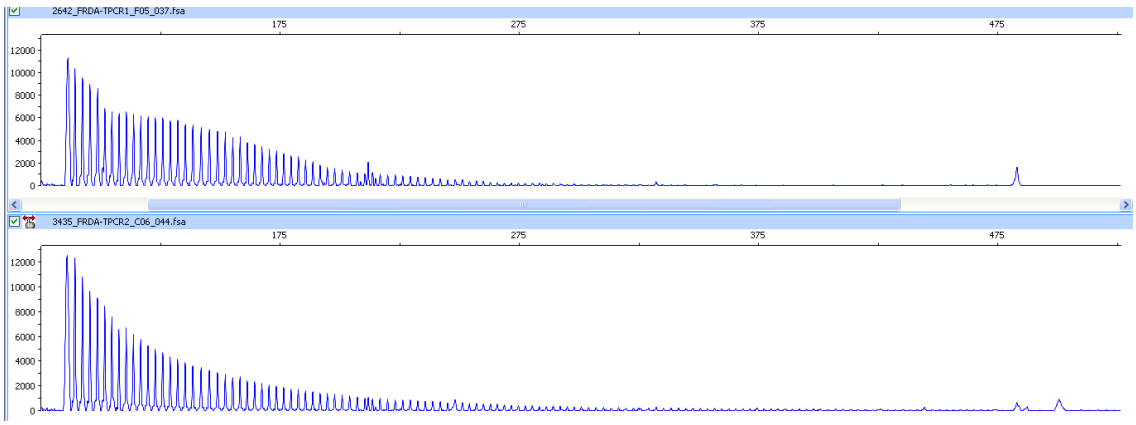

Figura 3. Resultados de TP-PCR. Perfiles compatibles con presencia de alelos expandidos en la muestra.

08 Troubleshooting

La tabla siguiente representa los resultados que podrían ser obtenidos en las muestras analizadas, el control positivo, el marcador de tamaño, y el control negativo. En caso de obtener un resultado inesperado, la interpretación y la razón más probable de dicho resultado se muestran a continuación:

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

Problema	Muestras analizadas	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]

(1) Cantidad y/o calidad de ADN molde insuficiente: Comprobar que el ADN ha sido correctamente cuantificado y usar la cantidad indicada de ADN. 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 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 6 de estas instrucciones de uso, 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 dando lugar a errores 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 (picos en el electroferograma) que aparecen como picos menos intensos y de menor tamaño (3 pares de bases menores) que el pico predominante.

09 Limitaciones

09.1 | Equipos

Imegen® Friedreich 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® Friedreich 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). En caso de utilizar otro equipo diferente al mencionado anteriormente, seguir las especificaciones del protocolo de dichas plataformas.

09.2 | Reactivos

Imegen® Friedreich se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 5 de este documento (Equipos., reactivos 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.

09.3 | 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