



Instrucciones de uso

Imegen[®] Alfa-1-AT

Ref. IMG-211

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.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 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® Alfa-1-AT** 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	DIC 2023	Revisión y actualización del apartado "3. Características técnicas".
Versión 08	DIC 2022	Modificación de la temperatura de almacenamiento y envío del reactivo GENERAL MASTER MIX (Sección 5).
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	NOV 2018	Tipo de experimento, Quantitation–Standard Curve en el apartado 7.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real para el 7500 Fast y StepOne

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	10
07.1	Preparación de las reacciones de amplificación	10
07.2	Configuración del programa de PCR a tiempo real para 7500 Fast y StepOne	11
07.3	Configuración del programa de PCR a tiempo real para LightCycler Capillar	12
07.4	Configuración del programa de PCR a tiempo real para LightCycler 480	12
08	Análisis de los resultados	13
09	Troubleshooting	19
10	Limitaciones	20
10.1	Equipos	20
10.2	Reactivos	20
10.3	Estabilidad del producto	20

01 Información general

El gen SERPINA1 (NM_001002235), localizado en la región cromosómica 14q32.1, codifica la alfa-1-antitripsina (AAT), también conocida como inhibidor de la proteasa (PI). La acción inhibidora más importante de AAT es frente a la elastasa de los neutrófilos, una proteasa liberada normalmente para combatir infecciones, pero que si no es controlada por la ATT puede llegar a degradar la elastina de las paredes alveolares, así como otras proteínas estructurales de una variedad de tejidos.

Mutaciones en el gen SERPINA1 provocan deficiencia en AAT, un trastorno autosómico recesivo, cuya manifestación más común se asocia principalmente al riesgo de enfisema, que se hace evidente a partir de la tercera década. Una manifestación menos común de la deficiencia de ATT es la enfermedad hepática que se presenta en niños y adultos y puede ocasionar cirrosis e insuficiencia hepática.

Referencias

- > <https://www.omim.org/entry/107400>
- > <https://www.omim.org/entry/613490>

02 Uso previsto

El kit **Imegen® Alfa-1-AT** emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes en un ensayo de PCR a tiempo real validado para detectar las mutaciones Glu342Lys (PI-Z; rs28929474; c.1096_G>A) y Glu264Val (PI-S; rs17580; c.863_A>T) del gen SERPINA1. Además, utiliza como control positivo una mezcla v/v de ADN sintético con una copia del alelo mutado para cada mutación y una copia con los alelos normales, para el análisis cualitativo.

Imegen® Alfa-1-AT 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 analizadas previamente por el servicio de genética médica de Health in Code S.L., y ADN sintético con una única copia de las secuencias diana (normal o mutante) de las regiones objeto de análisis del gen SERPINA1, y detecta específicamente los genotipos esperados.

El material necesario para este estudio es ADN genómico procedente de sangre periférica. La cantidad total de ADN necesario es 100 ng.

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

- **PI-S Master Mix:** contiene oligonucleótidos, sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM y VIC) y agua para la amplificación y detección de los alelos normal y/o mutante objeto de análisis.
- **PI-Z Master Mix:** contiene oligonucleótidos, sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM y VIC) y agua para la amplificación y detección de los alelos normal y/o mutante objeto de análisis.
- **General Master Mix:** Master Mix de PCR con los nucleótidos, MgCl₂, enzima y buffer para llevar a cabo la PCR a tiempo real.
- **Positive Control:** control positivo para la amplificación simultánea de los alelos normal y mutante objeto de análisis (simulando una muestra heterocigota para ambas mutaciones).

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
PI-S Master Mix	Disco rojo	2 x 180 µl	-20°C
PI-Z Master Mix	Disco azul	2 x 180 µl	-20°C
General Master Mix	Disco blanco	1320 µl	-20°C
Positive Control	Tapa roja	1 x 200 µl	-20°C

Tabla 1. Componentes del kit Imegen® Alfa-1-AT

(*) **General Master Mix:** Se recomienda mantener congelado hasta su primer uso, protegido de la luz, y almacenado entre 2- 8 °C después de su primer uso.

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real (canales FAM y VIC)
- Micropipetas de 10 μ L, 20 μ L y 200 μ L
- *Vortex*
- Centrifuga

Reactivos:

Para PCR en Lightcycler 480 (Roche):

- Agua libre de nucleasas

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL.
- Material fungible óptico compatible con el termociclador de PCR a tiempo real
- Guantes de látex

07 Protocolo de ensayo

07.1 | 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.

Para llevar a cabo el análisis cualitativo, serán necesarias dos reacciones de amplificación, una para cada mutación. Se recomienda preparar una reacción de amplificación por muestra e incluir un control negativo de PCR, para descartar contaminación de los reactivos y el control positivo.

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.

A continuación, independientemente del termociclador de PCR a tiempo real de que disponga coloque los tubos, placas o capilares en el termociclador de PCR a tiempo real. Para configurar el programa de amplificación es necesario tener en cuenta los fluoróforos de las sondas empleadas (Ver Tabla 4).

Sonda	Receptor	Genotipado	Emisor o <i>Quencher</i>
PIS-T-P	VIC™	Normal	MGB
PIS-T-P	FAM™	Mutante	MGB
PIZ-G-P	VIC™	Normal	MGB
PIZ-A-P	FAM™	Mutante	MGB

Tabla 2. Información de las sondas.

A continuación, según el equipo de PCR a tiempo real de que disponga siga los puntos 2-4 correspondientes:

➤ PCR en 7500 FAST, StepOne o StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific)

02 En tubos de 1.5 mL, uno para el análisis de cada mutación, añadir las cantidades necesarias de reactivos de la tabla 2:

Reactivos	Volumen por reacción
PI-S o PI-Z Master Mix	7.5 µL
General Master Mix	12.5 µL

Tabla 3. Cantidad de reactivos necesaria por reacción para el uso 7500 FAST o StepOne.

- 03 Agitar en *vortex* y dar *spin* al *mix* de PCR y dispensar 20 µL en los correspondientes pocillos del material fungible óptico o capilares empleados.
- 04 Añadir 5 µL de las muestras diluidas a una concentración de 10 ng/µL y 5 µL del control positivo, o de agua libre de nucleasas (control negativo) a los pocillos correspondientes del material fungible óptico o capilar empleado.

➔ Lightcycler 480 o Lightcycler capilar (Roche)

- 02 En tubos de 1.5 mL, uno para el análisis de cada mutación, añadir las cantidades necesarias de reactivos de la tabla 3:

Reactivos	Volumen por reacción
PI-S o PI-Z Master Mix	4 µL
LightCycler FastStart DNA Master HybProbe	1 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1 µL
Agua	9 µL

Tabla 4. Cantidad necesaria de reactivos por reacción empleando un LightCycler 480 o capilar.

- 03 Agitar en *vortex* y dar *spin* al *mix* de PCR y dispensar 15 µL en los correspondientes pocillos del material fungible óptico o capilares empleados.
- 04 Añadir 5 µL de las muestras diluidas a una concentración de 10 ng/µL y 5 µL del control positivo, o de agua libre de nucleasas (control negativo) a los pocillos correspondientes del material fungible óptico o capilar empleado.

07.2 | Configuración del programa optimizado de PCR a tiempo real para 7500 Fast y StepOne

- ◇ Tipo de experimento: Quantitation- Standard curve
- ◇ Velocidad de rampa: Standard
- ◇ Volumen de reacción: 25 µL
- ◇ Referencia basal ROX™ para 7500 FAST y StepOne: incluida
- ◇ Programa óptimo:

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

Tabla 5. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST y StepOne (Thermo Fisher Scientific).

(*) Detección de la fluorescencia

07.3 | Configuración del programa optimizado de PCR a tiempo real para LightCycler Capilar (Roche)

- ◇ Samples > Selected Channels: Seleccionar 530 y 560
- ◇ Programa óptimo:

Programs						
Program Name		Cycles			Analysis Mode	
Precalentamiento		1			None	
Cuantificación		50			Quantification	
Frío		1			None	
Precalentamiento Temperature Targets						
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
95	00:10:00	20	0	0	0	None
Cuantificación Temperature Targets						
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:02	20	0	0	0	None
60	00:00:12	20	0	0	0	Single
72	00:00:08	20	0	0	0	None
Frío Temperature Targets						
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
40	00:00:30	20	0	0	0	None

Tabla 6. Programa de PCR óptimo para LightCycler Capilar (Roche).

07.4 | Configuración del programa optimizado de PCR a tiempo real para LightCycler 480 (Roche)

Campos	Etapa 1 Activación enzimática	Etapa 2 PCR			Etapa 3
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	50 ciclos			1 ciclo final
		Desnaturalización	Unión de oligonucleótidos	Extensión	
Temperatura	95°C	95°C	60°C	72°C	40°C
Tiempo	10 minutos	5 segundos	10 segundos	15 segundos*	20 segundos

Tabla 7. Programa de PCR óptimo para e termociclador LightCycler 480.

(*) Detección de la fluorescencia

08 Análisis de los resultados

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

- ◇ Comprobar que en el control negativo de PCR no hay amplificación, ni en el canal FAM ni en el canal VIC.
- ◇ Comprobar que en el control positivo hay señal de amplificación tanto en el canal FAM como en el canal VIC en ambos sistemas.
- ◇ Para analizar las muestras hay que emplear un software específico del termociclador de PCR a tiempo real utilizado.

A continuación, se muestran los posibles resultados obtenidos con el kit Imegen® Alfa-1-AT usando diferentes termocicladores.

08.1 | Posibles resultados obtenidos con 7500 Fast y StepOne

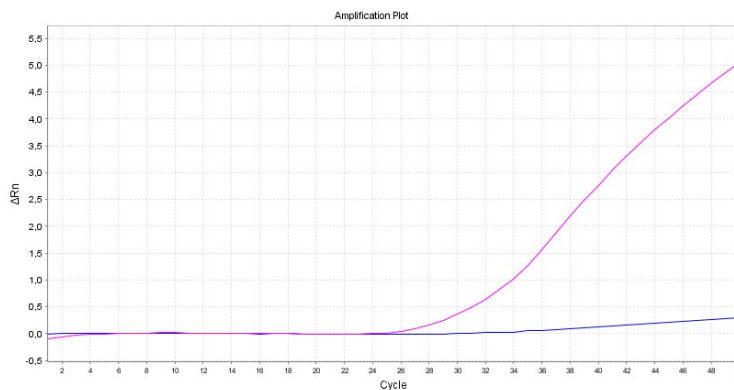


Figura 1. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal (A/A) para la mutación PI-S. Se observa una clara amplificación en el canal VIC y una señal de amplificación residual en el canal FAM.

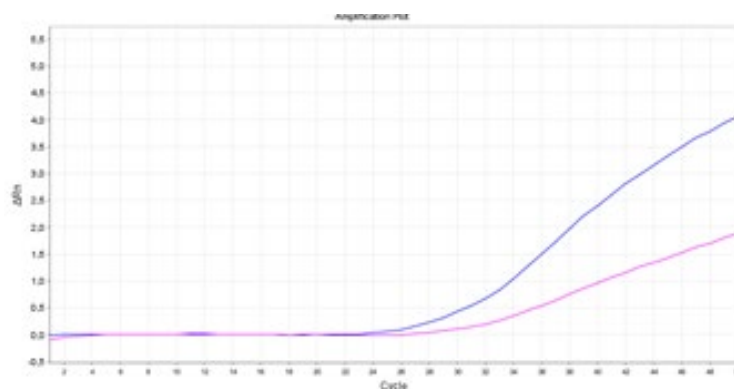


Figura 2. Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (A/T) para la mutación PI-S. Se observa señal en ambos canales, FAM y VIC, siendo la intensidad de fluorescencia mayor en el canal FAM.

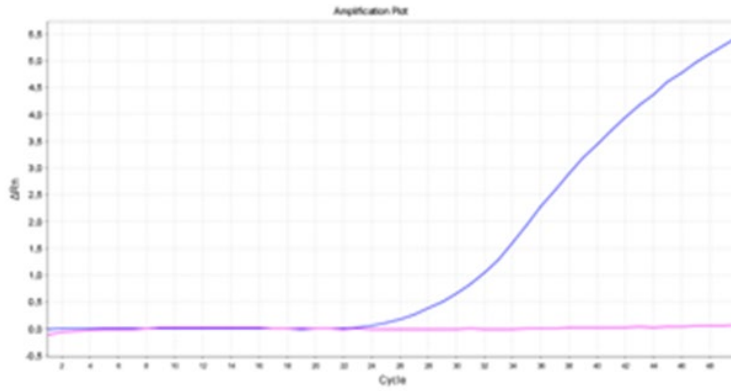


Figura 3. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (T/T) para la mutación PI-S. Sólo se observa amplificación en el canal FAM.

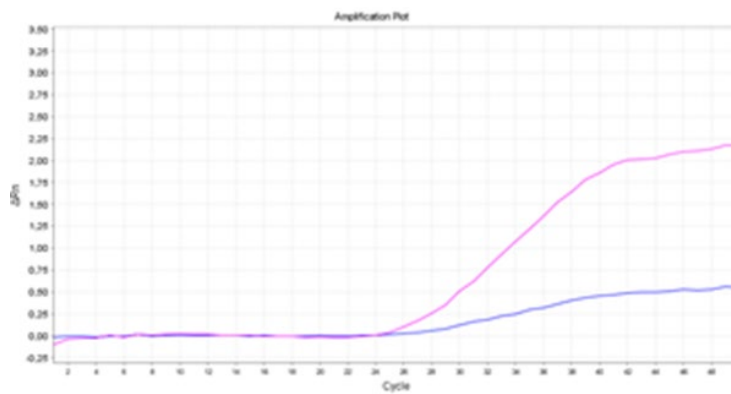


Figura 4. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal (G/G) para la mutación PI-Z. Se observa una clara amplificación en el canal VIC y una señal de amplificación residual en el canal FAM.

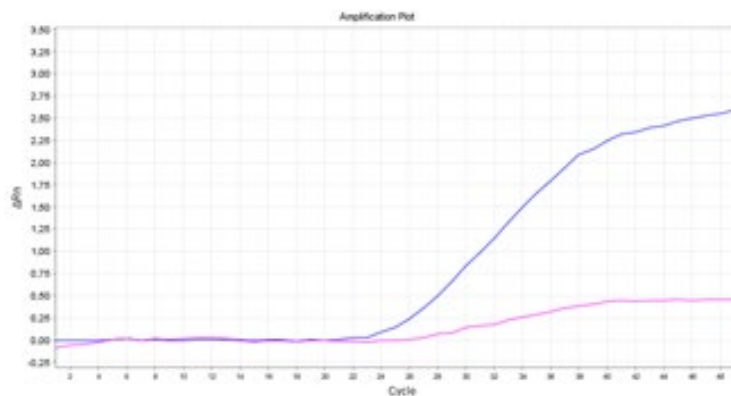


Figura 5. Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (G/A) para la mutación PI-Z. Se observa señal en ambos canales, FAM y VIC, siendo la intensidad de fluorescencia mayor en el canal FAM.

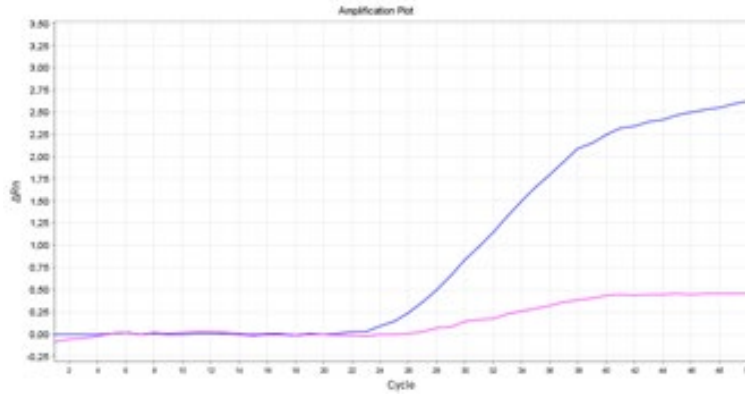


Figura 6. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (A/A) para la mutación PI-Z. Sólo se observa amplificación en el canal FAM.

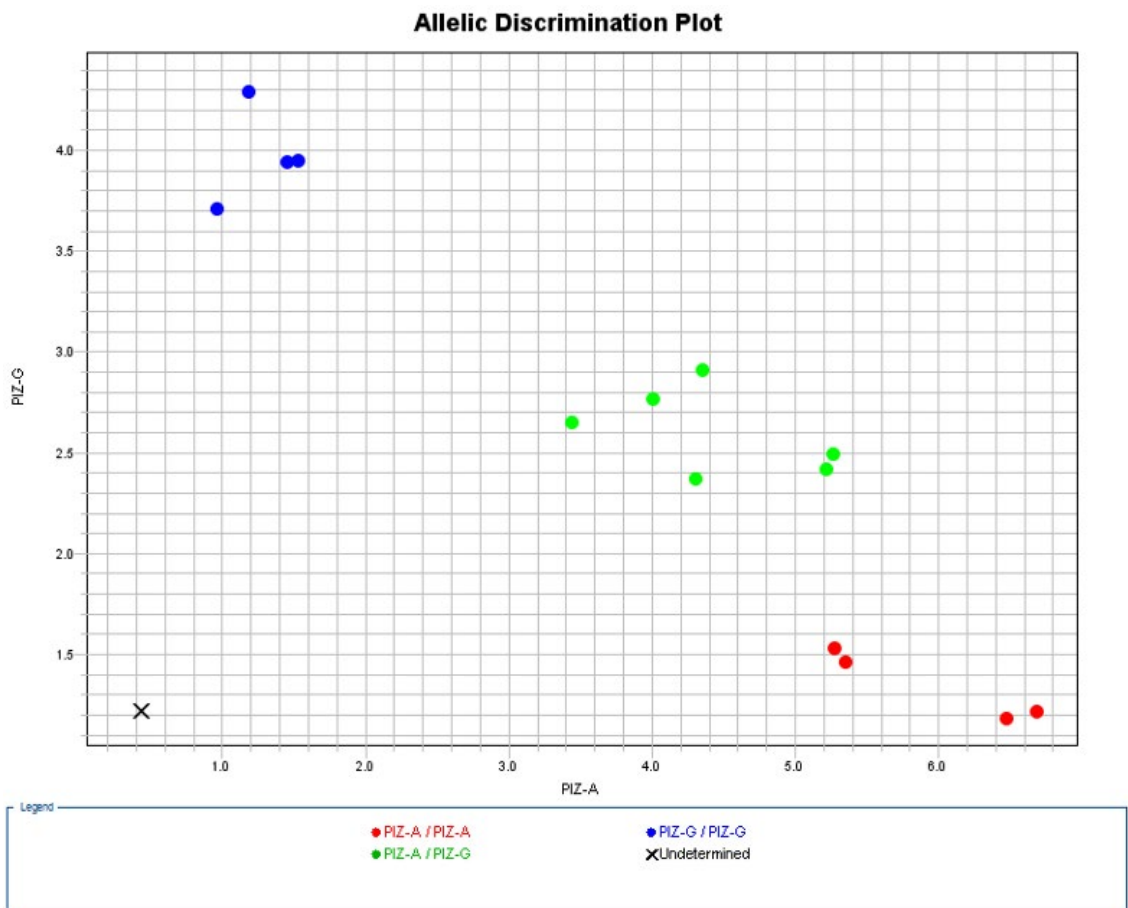


Figura 7. Ejemplo del gráfico de discriminación alélica (sistema PI-Z).

08.2 | Posibles resultados obtenidos con LightCycler

+ Sistema PI-S, canal FAM (530 nm)

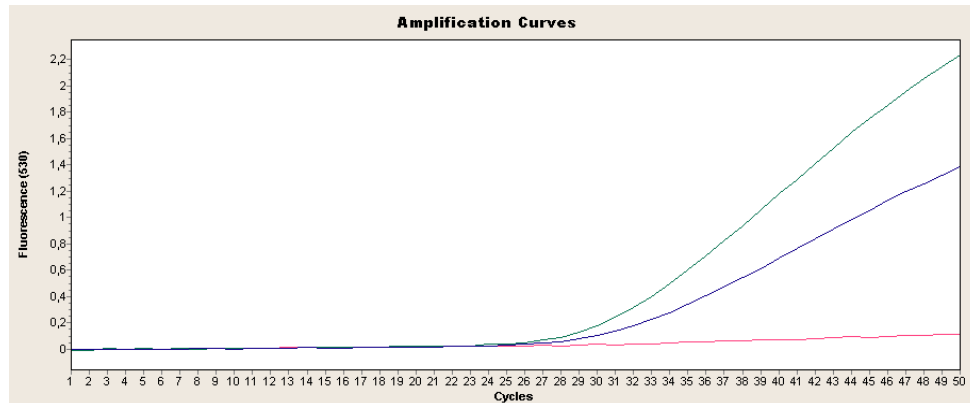


Figura 8. Resultados obtenidos. En el homocigoto normal (A/A) (verde) y en el heterocigoto (A/T) (azul) se observa una clara amplificación en el canal FAM. En el homocigoto mutante (T/T) (rosa) no hay amplificación en el canal FAM.

+ Sistema PI-S, canal VIC (560 nm)

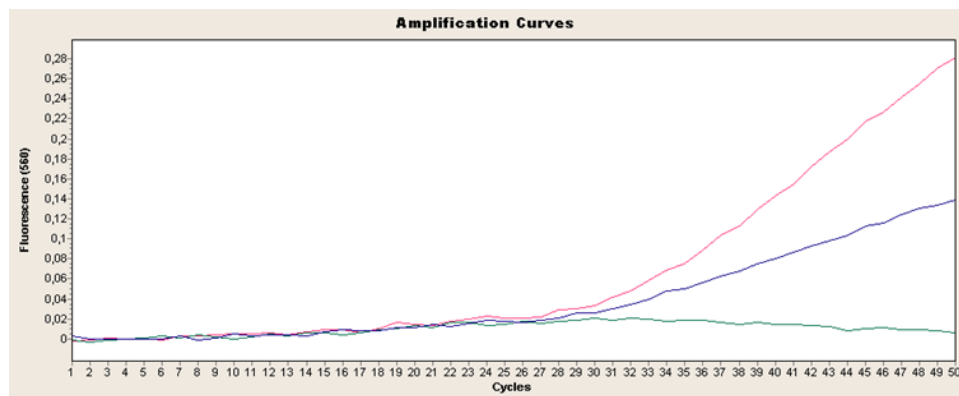


Figura 9. Resultados obtenidos. En el homocigoto normal (A/A) (verde) no se observa amplificación en el canal VIC. En el heterocigoto (A/T) (azul) y en el homocigoto mutante (T/T) (rosa) se observa una clara amplificación en el canal VIC.

+ Sistema PI-Z, canal FAM (530 nm).

En todas las figuras de resultados se incluye la señal procedente del control positivo incluido en el kit (azul).

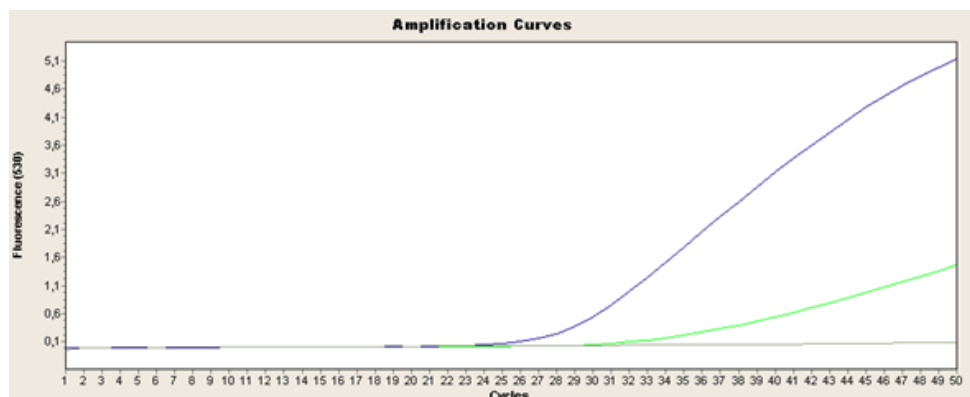


Figura 10. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal (G/G). Se observa una señal de amplificación residual en el canal FAM (verde).

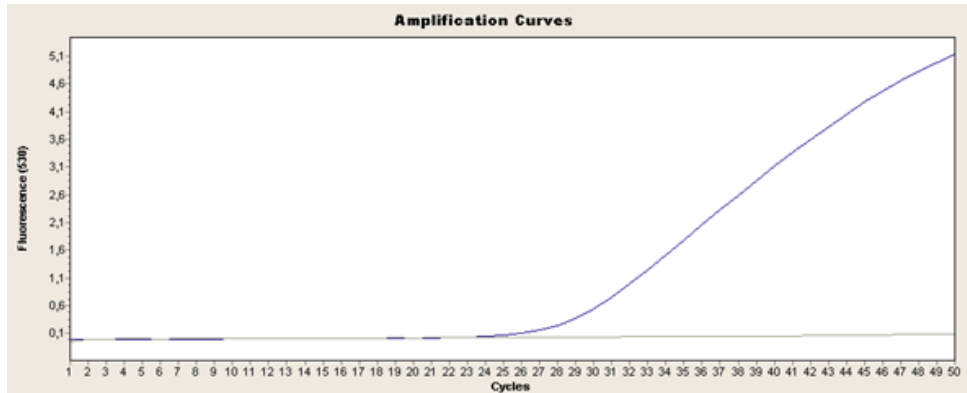


Figura 11. Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (G/A). Clara amplificación en el canal FAM.

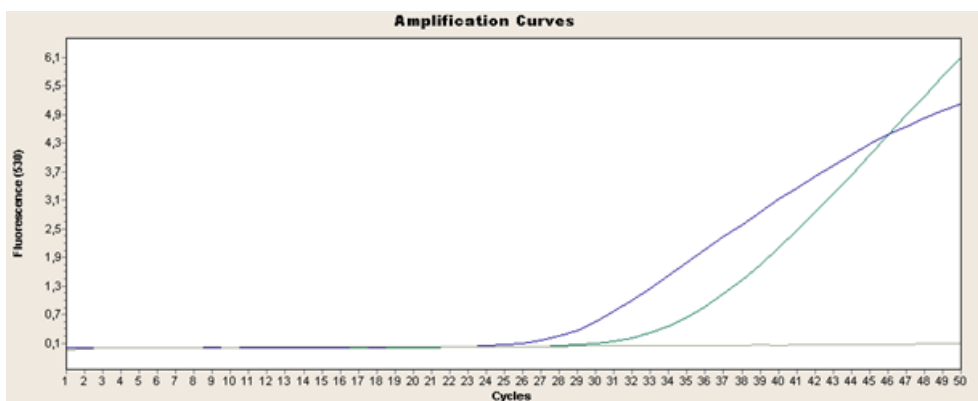


Figura 12. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (A/A). Clara amplificación en el canal FAM.

+ Sistema PI- Z, canal VIC (560 nm).

En todas las figuras de resultados se incluye la señal procedente del control positivo incluido en el kit (azul).

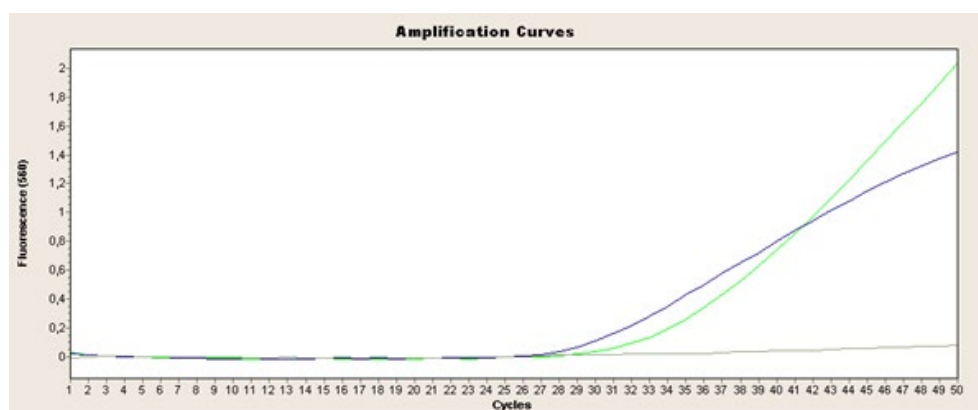


Figura 13. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal (G/G). Clara amplificación en el canal VIC (verde).

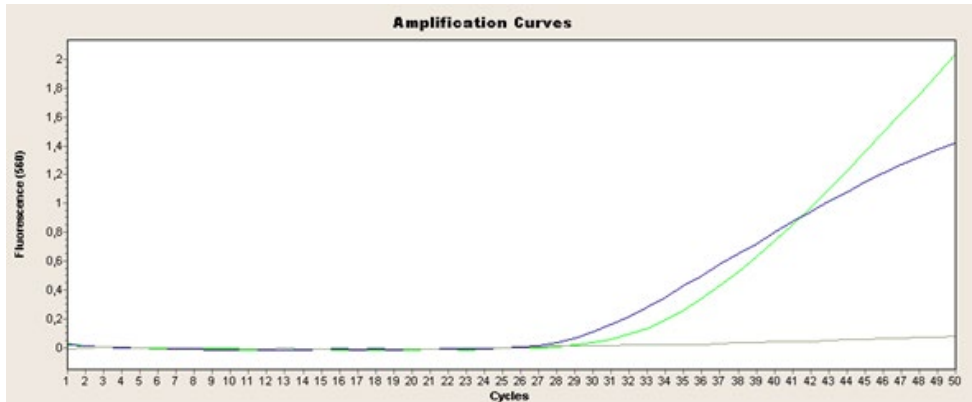


Figura 14. Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (G/A). Clara amplificación en el canal VIC.

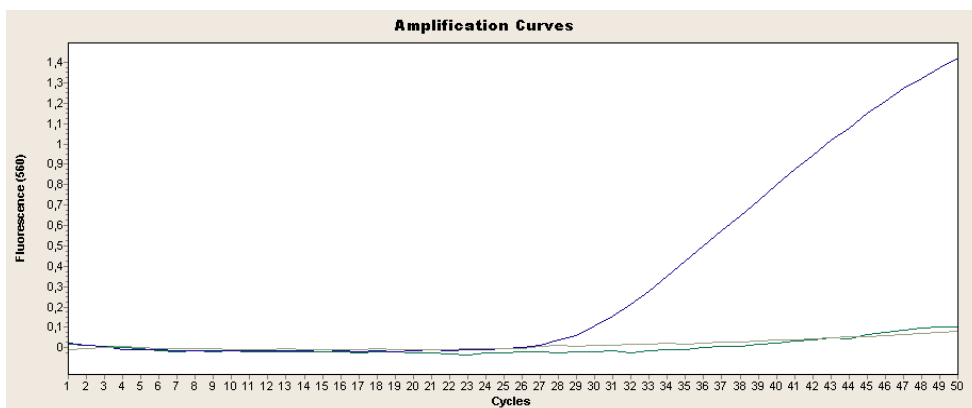


Figura 15. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (A/A). Ausencia de amplificación en el canal VIC (verde).

09 Troubleshooting

La tabla que aparece a continuación presenta gráficamente los resultados que podrían obtenerse del análisis de los diferentes controles y una muestra en un ensayo, así como su interpretación en ambos sistemas de PCR:

Muestra	Resultado		Causa
	FAM	VIC	
Control Positivo	+	+	Resultado esperado
	-	-	Fallo de amplificación en la PCR ¹
Muestra	+	+	Resultado esperado
	+	-	
	-	+	
	-	-	Fallo de amplificación de la muestra ²
Control Negativo de PCR	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con ADN humano ³
	+	-	
	-	+	

Tabla 8. Interpretación de los posibles resultados con el kit Imegen® Alfa-1-AT

(1) **Fallo de amplificación en la PCR:** Compruebe el programa de amplificación y la configuración de captura de la fluorescencia. Un fallo en la amplificación puede deberse a un problema técnico en la configuración del programa de PCR.

(2) **Fallo de amplificación de la muestra:** Compruebe que la cuantificación de la muestra es la recomendada, si fuese así el resultado especificado puede deberse a que la muestra se encuentre altamente degradada.

(3) **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. Limpie 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. Prepare en último lugar la reacción de PCR que contiene el control positivo, con el fin de evitar la contaminación cruzada. En este caso se recomienda repetir el ensayo.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

Imegen® Alfa-1-AT ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- + *7500 FAST Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific)
- + *StepOne Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific)
- + *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific)
- + *LightCycler Capillar* (Roche)
- + *LightCycler 480* (Roche)

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.

10.2 | Reactivos

Imegen® Alfa-1-AT se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual (Equipos y materiales necesarios que no se suministran).

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



Conoce todos nuestros
kits de diagnóstico

