Instrucciones de uso

Imegen® HFE

Ref. IMG-218

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® HFE 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 por Health in Code, S.L. en España.

Modificaciones de las instrucciones de uso (IUF)		
Versión 10	DIC 2023	Revisión y actualización del apartado "3. Características técnicas".
Versión 09	DIC 2022	Actualización de las referencias en el apartado 1. Modificaciones en los apartado 2, 3, 5 y 8.
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	ENE 2022	Modificación del control positivo en el apartado 7. Protocolo de ensayo, Introducción de los controles heterocigotos en el apartado 5. Contenido y condiciones de almacenamiento. Todos los cambios se introducen a partir del lote 21820C004.

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 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 11

08 **Análisis de los resultados** 12

09 **Troubleshooting** 15

10 **Limitaciones** 16

10.1 | Equipos 16

10.2 | Reactivos 16

10.3 | Estabilidad del producto 16

01 Información general

El gen *HFE*, localizado en la región cromosómica 6p22.2, codifica una proteína de membrana (perteneciente a la familia de moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad HLA-A) que participa en la regulación de la hormona hepcidina, considerada crucial en la regulación de la absorción y cinética del hierro en el organismo y que se expresa, en niveles altos, en órganos como el hígado y el intestino delgado.

Las mutaciones p. His63Asp, p.Ser65Cys y p.Cys282Tyr en el gen *HFE*, impiden que la proteína HFE alcance la superficie celular y no pueda interaccionar con la hepcidina y los receptores de transferina. Esto provoca que se absorba demasiado hierro en la dieta el cual acabe acumulándose en los órganos, y especialmente en el hígado, generando radicales libres, causantes de daño orgánico: hemocromatosis.

Referencias

- *Martha-Spyridoula Katsarou, et al. Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene. Elsevier, Vitamins and Hormones, 2019; Volumen 110.*
- *Antonello Pietrangelo. Hereditary Hemochromatosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. Gastroenterology, 2010; Volume 139, Issue 2.*
- *E. H. Hanson, G. Imperatore, W. Burke. HFE Gene and Hereditary Hemochromatosis: A HuGE Review, American Journal of Epidemiology, 2001; Volume 154, Issue 3.*
- *Paulo C. J. L. Santos. Molecular Daignostic and Pathogenesis of Hereditary Hemochromatosis. Int. J. Mol. Sci. 2012, 13(2), 1497-1511.*
- *https://www.omim.org/entry/613609*

02 Uso previsto

El kit Imegen® HFE emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes en un análisis cualitativo de PCR a tiempo real validado para detectar simultáneamente las variantes en el gen HFE asociados a hemocromatosis. Concretamente el ensayo permite detectar los alelos:

- **HFE63 [NM_000410.3:c.187C>G (p.His63Asp)].**
- **HFE65 [NM_000410.3:c.193A>T (p.Ser65Cys)].**
- **HFE282 [NM_000410.3:c.845G>A (p.Cys282Tyr)].**

Este análisis genético permite detector la presencia o ausencia de tales genotipos en tres reacciones de PCR a tiempo real multiplexadas, que incluyen la ampliación simultánea del genotipo de referencia y del genotipo alternativo.

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

03 Características técnicas

El kit Imegen® HFE ha sido validado en las plataformas:

- *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)

Para la validación se ha utilizado muestras de genética médica de Health in Code S.L., previamente analizadas por NGS; muestras de referencia de *Coriell Institute;* y ADN sintético con la secuencia de interés (fabricado y certificado por la empresa GenScript).

Especificaciones analíticas:

- Tipo de muestras: ADN genómico procedente de sangre periférica.
- Cantidad de ADN recomendado:150 ng de ADN.

El kit Imegen® HFE es compatible con plataformas de PCR a tiempo real con canales de fluorescencia FAM™ y VIC™.

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.
- 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.
- El fabricante no se hace responsable de los resultados obtenidos cuando el análisis bioinformático se realiza en una plataforma de análisis distinta a **Client Site**.

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:

- ***HFE282 Master Mix:*** oligonucleótidos específicos, sondas marcadas en FAM™ y VIC™ y agua libre de nucleasas para la detección de los alelos wild type y mutado (c.845G>A).
- ***HFE63 Master Mix:*** oligonucleótidos específicos, sondas marcadas en FAM™ y VIC™ y agua libre de nucleasas para la detección de los alelos wild type y mutado (c.187C>G).
- ***HFE65 Master Mix:*** oligonucleótidos específicos, sondas marcadas en FAM™ y VIC™ y agua libre de nucleasas para la detección de los alelos wild type y mutado (c.193A>T).
- ***General Master Mix:*** *Master Mix* de PCR con los nucleótidos, $MgCl_2$, enzima y *buffer* necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real.
- ***Positive Control:*** muestras de referencia de de *Coriell* heterocigotas para cada sistema.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
HFE282 Master Mix	Disco morado	2 x 180 µl	-20°C
HFE63 Master Mix	Disco verde	2 x 180 µl	-20°C
HFE65 Master Mix	Disco azul	2 x 180 µl	-20°C
General Master Mix	Disco blanco	2 x 900 µl	-20°C*
HFE282 C+	Tapa morada	40 µl	-20°C
HFE63 C+	Tapa verde	40 µl	-20°C
HFE65 C+	Tapa azul	40 µl	-20°C

Tabla 1. Componentes del kit Imegen® HFE

(*) ***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 µL, 20 µL y 200 µL
- *Vortex*
- Centrífuga

Materiales:

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

Kits complementarios

Para el análisis de genotipado de dianas relacionadas con enfermedades hematológicas, y en concreto, con alteraciones en el proceso de coagulación, Health in Code S.L., también ofrece los kits:

- Imegen® Cambridge II (ref IMG-199)
- Imegen® MTHFR (ref IMG-212)
- Imegen® Factor II (ref IMG-214)
- Imegen® Factor XII (ref IMG-215)
- Imegen® MTHFRII (ref IMG-216)
- Imegen® Factor V (ref IMG-217)

Todos ellos junto con el kit Imegen® HFE, 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

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, por cada uno de los tres sistemas analizados (HFE282, HFE63 y HFE65), se recomienda preparar una reacción de amplificación por muestra e incluir un control negativo de PCR, para descartar contaminación de los reactivos y un control positivo para garantizar el buen funcionamiento del programa de amplificación.

> IMPORTANTE: Si en el análisis de resultados se quiere utilizar la herramienta "*auto-calling*" para obtener el genotipado de una muestra automáticamente con el *software* de análisis, se debe incluir un control positivo y un control negativo en el ensayo.

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.

02 Agitar cada uno de los reactivos en *vortex* y mantener en frío.

03 En tubos de 1.5 mL preparar los tres mix de PCR añadiendo los siguientes reactivos por muestra:

	Cantidad por reacción		
Reactivos	**Mix HFE282**	**Mix HFE63**	**Mix HFE65**
General Master Mix	12.5 µL	12.5 µL	12.5 µL
HFE282 Master Mix	7.5 µL	–	–
HFE63 Master Mix	–	7.5 µL	–
HFE65 Master Mix	–	–	7.5 µL

04 Agitar en *vortex* y dar *spin* al mix de PCR y dispensar 20 µL en los correspondientes pocillos del material fungible óptico.

05 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.

HFE282 Master Mix	HFE63 Master Mix	HFE65 Master Mix
M1	M1	M1
M2	M2	M2
M3	M3	M3
CP	**CP**	**CP**
NTC	**NTC**	**NTC**

Figura 1. Ejemplo de la plantilla de PCR. M, muestras; NTC, no template control; CP, positive control.

06 Colocar los tubos o placas en el termociclador de PCR a tiempo real y configurar el programa de amplificación tal y como se indica en el siguiente apartado.

07.2 | Configuración del programa PCR a tiempo real

- **Tipo de experimento**: Genotyping
- **Velocidad de rampa**: Standard
- **Volumen de reacción**: 25 µL
- **Referencia basal ROX™**: incluida
- **Fluoróforos de las sondas TaqMan®**:

Mix de PCR	Sonda	Emisor	Genotipado	*Quencher*
HFE282	**HFE282-G-P**	VIC™	Wild Type	MGB
	HFE282-A-P	FAM™	c.845G>A	MGB
HFE63	**HFE63-C-P**	VIC™	Wild Type	MGB
	HFE63-G-P	FAM™	c.187C>G	MGB
HFE65	**HFE65-A-P**	VIC™	Wild Type	MGB
	HFE65-T-P	FAM™	c.193A>T	MGB

Tabla 2. Información de las sondas

- **Programa óptimo**:

Campos	Etapa 1 Lectura Pre-PCR	Etapa 2 Activación enzimática	Etapa 3 PCR		Etapa 4 Lectura Post-PCR
			50 ciclos		
Nº de ciclos	1 ciclo	1 ciclo	Desnaturalización	Unión de oligonucleótido/ Extensión	1 ciclo
Temperatura	60°C	95°C	95°C	60°C	60°C
Tiempo	1 minuto*	10 minutos	15 segundos	1 minuto*	1 minuto*

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne (Thermo Fisher Scientific)

(*) Detección de la fluorescencia

08 Análisis de 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.
- 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® HFE

Muestra homocigota *wild type*:

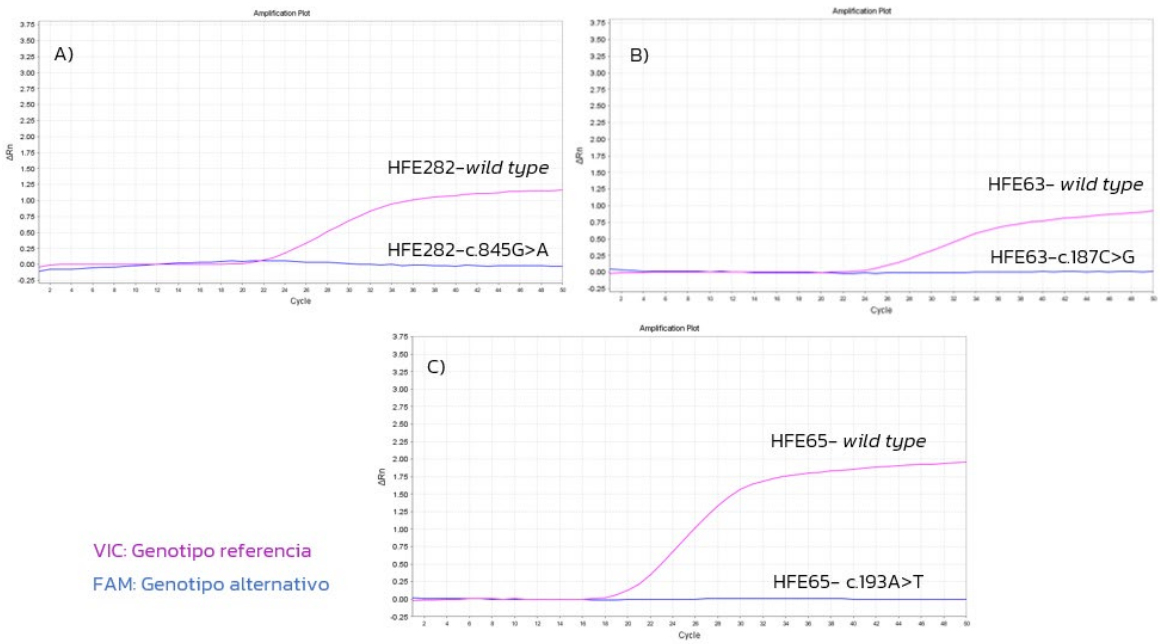

Figura 2. ***A)*** *Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal (G/G) para el sistema HFE282.* ***B)*** *Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal (C/C) para el sistema HFE63.* ***C)*** *Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota (A/A) para el sistema HFE62. Sólo se observa amplificación en el canal VIC.*

↘ Muestra heterocigota:

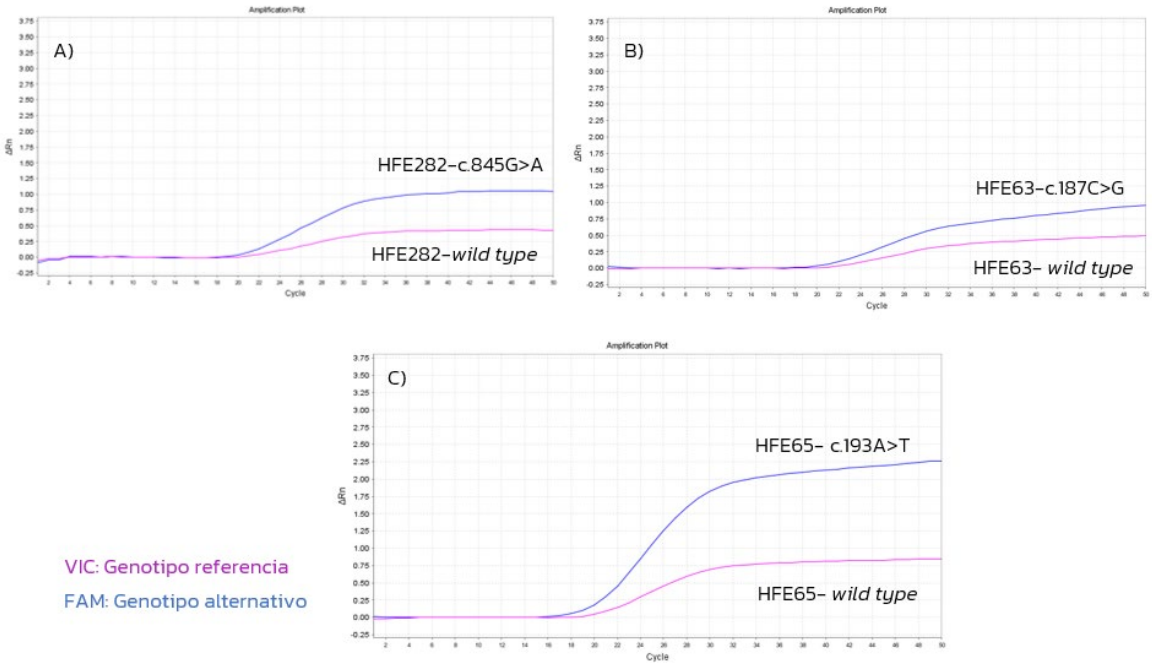

Figura 3. ***A)*** *Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (G/A) para el sistema HFE282.* ***B)*** *Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (C/G) para el sistema HFE63.* ***C)*** *Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (A/T) para el sistema HFE65. Se observa señal en ambos canales, FAM y VIC, siendo la intensidad de fluorescencia mayor en el canal FAM.*

↘ Muestra homocigota mutante:

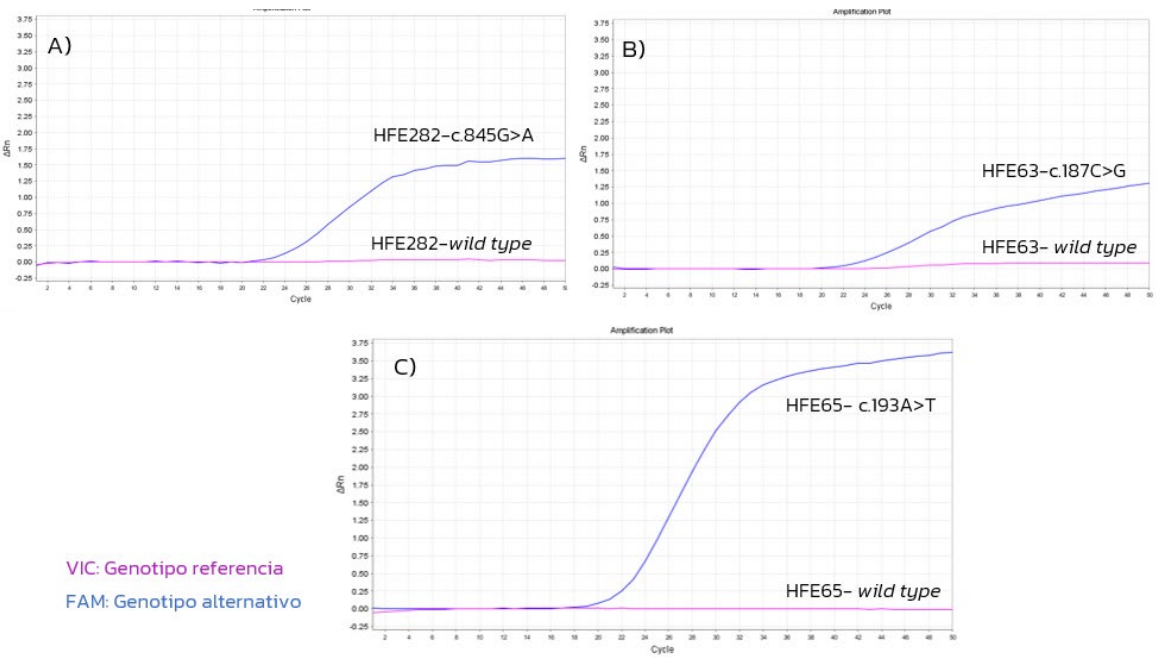

Figura 4. ***A)*** *Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (A/A) para el sistema HFE282.* ***B)*** *Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (G/G) para el sistema HFE63.* ***C)*** *Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (T/T) para el sistema HFE65. Solo se observa amplificación en el canal FAM.*

↘ Gráficos de discriminación alélica:

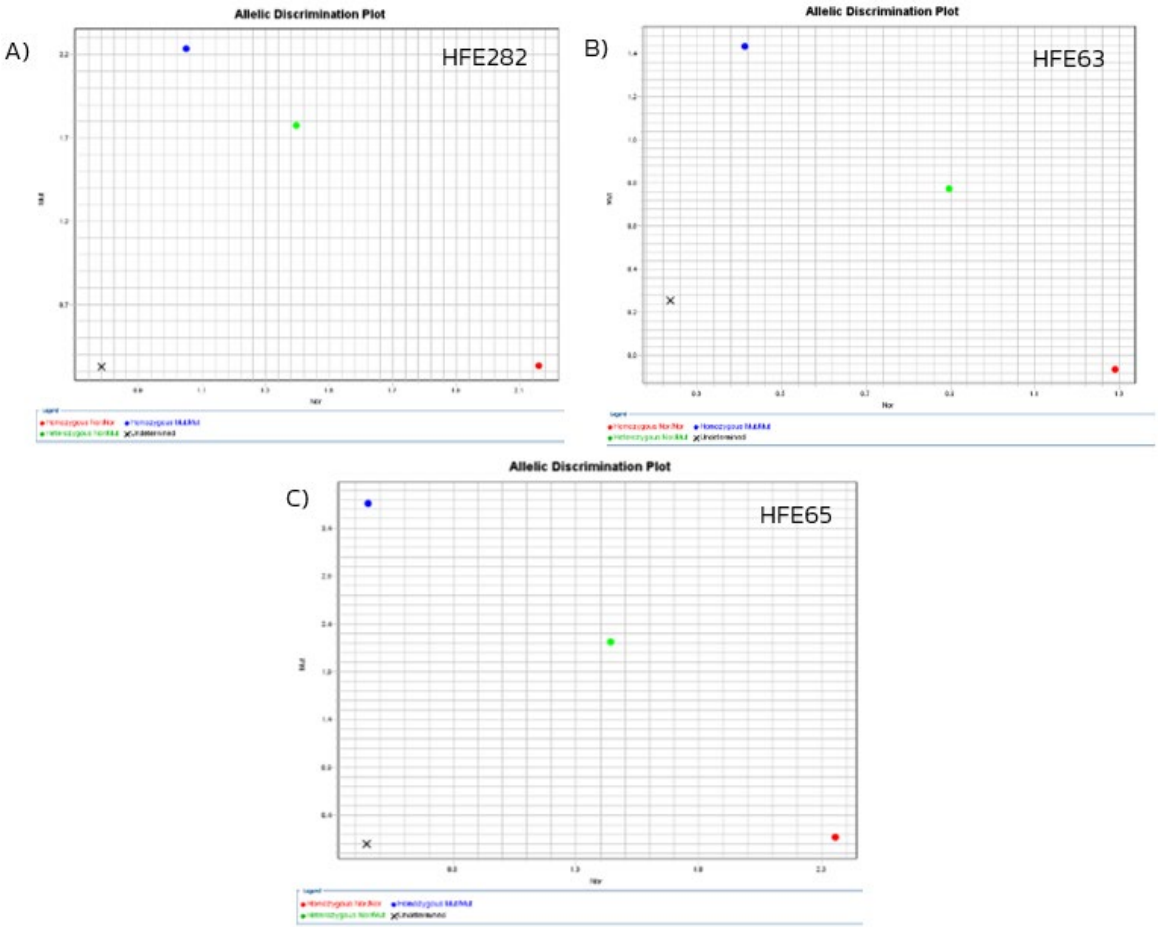

Figura 5. ***A)*** *Gráfico de discriminación alélica con el sistema HFE282.* ***B)*** *Gráfico de discriminación alélica con el sistema HFE63.* ***C)*** *Gráfico de discriminación alélica con el sistema HFE65. En rojo se marcan las muestras homocigotas normales, en verde las heterocigotas y en azul las homocigotas mutantes con cada uno de los sistemas.*

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:

Control	Resultado		Causa
	FAM	VIC	
Control Positivo	+	+	Resultado esperado
	–	–	Fallo en la configuración de 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 4. Interpretación de los posibles resultados

(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

(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® HFE 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)

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® HFE 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).

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