

Manual de Usuario

imegen[®] Quimera Screening Multiplex Plus

Determinación de la informatividad de los
polimorfismos en quimeras hematopoyéticas
mediante PCR a tiempo real

REF : IMG-116-26

Instituto de Medicina Genómica SL
Agustín Escardino 9,
Parc Científic de la Universitat de València
46980 Paterna (Valencia, España)
+34 963 212 340 - info@imegen.es

imegen.es

Rev. 5

Rafer INNOVACIÓN
TECNOLÓGICA
PARA LABORATORIO

Imegen 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 diagnóstico in vitro. Imegen 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 Imegen, 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. Imegen 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 Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit imegen® Quimera Screening Multiplex Plus 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:

Teléfono: 963 212 340

e-Mail: info@imegen.es

***imegen®** es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España

Índice

1. Información del producto	4
2. Advertencias y precauciones	6
3. Contenido de kit	7
4. Equipos y materiales necesarios que no se suministran	9
5. PCR a tiempo real	10
Preparación de los reactivos	10
Preparación de las reacciones de amplificación	10
Configuración del programa de la PCR a tiempo real	11
6. Análisis de los resultados	14
7. Aplicación de seguimiento de pacientes	16

1. Información del producto

Descripción del Kit

El análisis de quimerismos moleculares, resultantes de un trasplante alogénico, se ha convertido en un método bien establecido para controlar la evolución del trasplante y para evaluar el riesgo de recaída.

Con el kit **imegen-Quimera** para PCR digital [dPCR] se puede determinar la presencia de quimerismos hematopoyéticos en el periodo post-trasplante mediante la cuantificación absoluta por dPCR, de polimorfismos de inserción/delección [INDELs] o alelos nulos. Para realizar dicha cuantificación es necesario analizar un gen de referencia [β -globina] y un polimorfismo informativo. Para casos de **trasplante de médula ósea**, se considera que un polimorfismo es informativo cuando se detecta en el receptor del trasplante y no en el donante y, para casos de **trasplante de órganos sólidos**, el marcador es informativo cuando se detecta en el donante y no en el receptor del trasplante. Para determinar la informatividad de los polimorfismos se han desarrollado los kits **imegen-Quimera Screening Multiplex Plus** [IMG-116-26], e **imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II** [IMG-116-25].

Para determinar la informatividad de los marcadores SRY y RhD no es necesario hacer un análisis molecular, ya que para casos de **trasplante de médula ósea** el marcador SRY es informativo cuando el receptor es varón y la donante es mujer y el RhD cuando el receptor tiene grupo sanguíneo Rh⁺ y el donante Rh⁻. Y para casos de **trasplante de órganos sólidos** el marcador SRY es informativo cuando la receptora es mujer y el donante es varón y el RhD cuando el receptor tiene grupo sanguíneo Rh⁻ y el donante Rh⁺.

La informatividad global acumulada de este panel, junto con los marcadores SRY y RhD, es del 99.1%. En caso de analizar también el panel **imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II** la informatividad global acumulada sería del 99.98%.

Toda la familia de kits *imegen-Quimera* para dPCR han sido desarrollados en colaboración con el Hospital Regional Carlos Haya de Málaga incluido en el Servicio Andaluz de Salud [SAS]. Fruto de este acuerdo, Imegen posee una licencia **exclusiva y mundial** sobre el Know-how de los productos para la fabricación y explotación comercial de los mismos.

A continuación se muestra el protocolo de trabajo a seguir cuando se emplean los kits *imegen-Quimera Screening Multiplex Plus* e *imegen-Quimera* para dPCR.

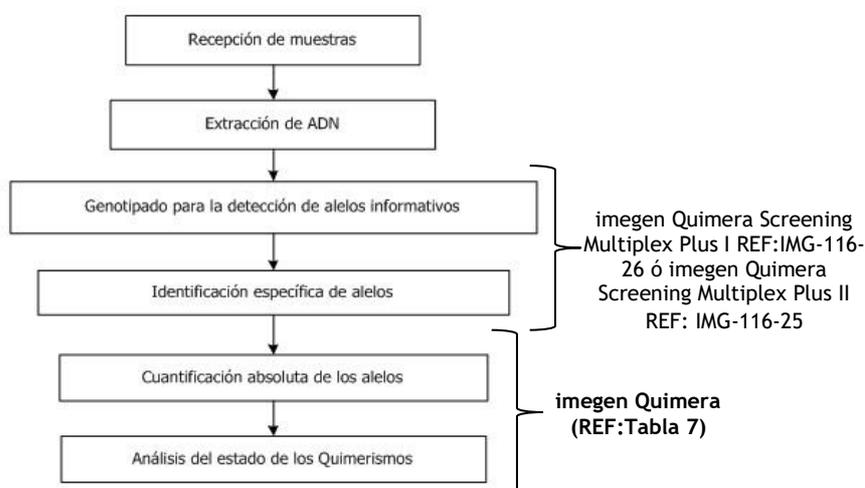


Imagen 1. Protocolo de trabajo para la detección y cuantificación de polimorfismos informativos

Uso previsto

El kit *imegen-Quimera Screening Multiplex Plus* permite el análisis de 16 polimorfismos de inserción/delección [INDELS] distintos mediante PCR Multiplex a tiempo real.

2. Advertencias y precauciones

Sólo para uso en diagnóstico in vitro. Precauciones de seguridad

1. *Seguir estrictamente las instrucciones de este folleto, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento.*
2. *No pipetear con la boca.*
3. *No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.*
4. *Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.*
5. *No verter los residuos de reactivos a la red de agua potable. Utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.*
6. *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.*
7. *Las hojas de datos de seguridad de los materiales de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición a Imegen.*

Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano y animal. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana y animal 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.

3. Contenido del kit

Componentes y almacenamiento del kit

El kit incluye:

- Una tira de 8 tubos que contiene un Máster de Screening Multiplex en cada tubo. Cada Máster está formado por dos parejas de oligonucleótidos y dos sondas TaqMan®-MGB con distintos marcajes (FAM™ o VIC®) para el análisis simultáneo de dos polimorfismos distintos.

Este kit está disponible para el análisis específico de alelo de un total de 16 INDELS mediante PCR multiplex. Estos análisis han sido diseñados empleando las mismas condiciones de PCR a tiempo real. Por tanto, esta técnica rápida y efectiva permite el análisis de distintos polimorfismos en paralelo.

Este kit contiene reactivos suficientes para analizar 10 muestras diferentes.

Tubo	Reacciones	INDELS	Conservación	Rehidratación
1	10 Reacciones	Q116-6I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-3I		
2	10 Reacciones	Q116-7I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-12D		
3	10 Reacciones	Q116-11I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-5I		
4	10 Reacciones	Q116-4I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-10I		
5	10 Reacciones	Q116-23I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-28I		
6	10 Reacciones	Q116-32I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-31I		

Tubo	Reacciones	INDELs	Conservación	Rehidratación
7	10 Reacciones	Q116-30D	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-29D		
8	10 Reacciones	Q116-27D	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-24I		

Tabla 1. Componentes del kit imegen-Quimera Screening Multiplex Plus y temperatura de conservación

*Una vez rehidratados, los reactivos deberán de ser conservados a -20°C.

Este kit es compatible con los equipos *LightCycler 480* [Roche], *7500 FAST*, *StepOne Real-Time PCR System* [Thermo Scientific], y todas aquellas plataformas de Real-time PCR que detecten la fluorescencia FAM y VIC.

4. Equipos y materiales necesarios que no se suministran

Equipos y materiales requeridos

En la siguiente tabla se muestran los equipos requeridos para el uso del kit **imegen-Quimera Screening Multiplex Plus**:

Equipos	
1	Termociclador de PCR a tiempo real
2	Micropipetas (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
3	Vórtex

Materiales	
1	ADN Polimerasa HotStart
2	Tubos ópticos de 0,2 mL
3	Tapas ópticas para tubos de 0,2 mL
4	Puntas de pipetas con filtro (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
5	Tubos estériles de 1.5 mL
6	Guantes de látex sin polvo

5. PCR a tiempo real

Preparación de los reactivos

Todos los reactivos incluidos en el kit están liofilizados. El primer paso antes de utilizar cualquiera de nuestros kits consistirá en rehidratar los reactivos añadiendo la cantidad de agua, libre de nucleasas, recogida en la siguiente tabla. Con el objetivo de facilitar la resuspensión de cada componente, se recomienda agitar y dar un *spin* a los tubos que contienen los reactivos y conservarlos a 4°C durante una hora antes de su uso.

Reactivos	Rehidratación
Másters de Screening	33 µL de agua/vial*

Tabla 2. Volumen de rehidratación

Si estos reactivos no van a ser utilizados tras la su rehidratación, recomendamos conservarlos a -20°C.

Preparación de las reacciones de amplificación

El ensayo deberá incluir las siguientes reacciones:

- Reacciones con la muestra del receptor.
- Reacciones con la muestra del donante.

El análisis simultáneo de los 16 INDELS con el kit **imegen-Quimera Screening Multiplex Plus** requiere la preparación de ocho mixes diferentes de PCR.

Cada mix de PCR estará formado por:

- Máster del Screening Multiplex
 - Máster-Mix PCR 2x [no incluido en el kit]
1. Descongelar la tira de 8 tubos que contiene los Masters de Screening y el ADN del receptor y del donante. Dar un vórtex a cada uno de los reactivos y mantener en frío.
 2. Añadir 45 μL de Máster Mix de PCR 2X y 18 μL de ADN del receptor a 50 ng/ μL en un tubo de 1,5 mL.
 3. Añadir 45 μL de Máster Mix de PCR 2X y 18 μL de ADN del donante a 50 ng/ μL en un tubo de 1,5 mL.
 4. Agitar con vórtex y pipetear 7 μL del Máster Mix con el ADN del receptor en 8 pocillos y 7 μL del Máster Mix con el ADN del donante en otros 8 pocillos.
 5. Añadir 3 μL de cada Máster de Screening tanto a los pocillos con ADN del receptor como a los pocillos con el ADN del donante.

Configuración de la PCR a tiempo real

En función del equipo que se vaya a emplear para llevar a cabo la PCR a tiempo real, se deberán de seguir las siguientes instrucciones para configurar el programa de amplificación:

7500 Fast o StepOne Real-Time PCR system [Thermo Scientific]

- Tipo de experimento: *Quantitation- Standard curve*
- Velocidad de rampa: *standard*
- Volumen de reacción: 10 μL
- Referencia basal ROX™: incluida
- Fluoróforos de las sondas TaqMan®:

Tubo	INDELs	Inserción (Alelo +)	Delección (Alelo -)	Marcaje	Emisor o Quencher
1	Q116-6I	X		FAM TM	MGB
	Q116-3I	X		VIC [®]	
2	Q116-7I	X		FAM TM	
	Q116-12D		X	VIC [®]	
3	Q116-11I	X		FAM TM	
	Q116-5I	X		VIC [®]	
4	Q116-4I	X		FAM TM	
	Q116-10I	X		VIC [®]	
5	Q116-23I	X		FAM TM	
	Q116-28I	X		VIC [®]	
6	Q116-32I	X		FAM TM	
	Q116-31I	X		VIC [®]	
7	Q116-30D		X	FAM TM	
	Q116-29D		X	VIC [®]	
8	Q116-27D		X	FAM TM	
	Q116-24I	X		VIC [®]	

Tabla 3. Información de las sondas incluidas en el kit imegen-Quimera Screening Multiplex Plus

- Programa óptimo:

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

Tabla 4. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne

*Detección de la fluorescencia

Lightcycler 480 [Roche]

- Programa óptimo:

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

Tabla 5. Programa de PCR óptimo para Lightcycler 480

*Detección de la fluorescencia

6. Análisis de los resultados

El análisis de los resultados se basa en la detección de un polimorfismo informativo, es decir, que se detecte en el receptor y no se detecte en el donante en el caso de trasplante de médula ósea y viceversa en el caso de trasplantes de órganos sólidos.

A continuación se muestra una tabla con los posibles resultados:

Reactivos	Resultados		Informatividad	
	Receptor	Donante	Médula Ósea	Órganos sólidos
Polimorfismo	+	+	No informativo	No informativo
Polimorfismo	+	-	Informativo	No informativo
Polimorfismo	-	-	No informativo	No informativo
Polimorfismo	-	+	No informativo	Informativo

Tabla 6. Posibles resultados e interpretación

En caso de haber detectado un polimorfismo informativo, con la finalidad de controlar la evolución del trasplante y de evaluar el riesgo de recaída, se recomienda adquirir el kit **imegen-Quimera** para dPCR relacionado con dicho polimorfismo:

INDELs	Nombre del Kit	Referencia
SRY	imegen-Quimera SRY dPCR	IMG-116-27
RhD	imegen-Quimera RhD dPCR	IMG-116-28
Q116-6I	imegen-Quimera Q116-6I dPCR	IMG-116-32
Q116-3I	imegen-Quimera Q116-3I dPCR	IMG-116-29
Q116-7I	imegen-Quimera Q116-7I dPCR	IMG-116-33
Q116-12D	imegen-Quimera Q116-12D dPCR	IMG-116-36
Q116-11I	imegen-Quimera Q116-11I dPCR	IMG-116-34

INDELs	Nombre del Kit	Referencia
Q116-5I	imegen-Quimera Q116-5I dPCR	IMG-116-31
Q116-4I	imegen-Quimera Q116-4I dPCR	IMG-116-30
Q116-10I	imegen-Quimera Q116-10I dPCR	IMG-116-35
Q116-23I	imegen-Quimera Q116-23I dPCR	IMG-116-37
Q116-28I	imegen-Quimera Q116-28I dPCR	IMG-116-42
Q116-32I	imegen-Quimera Q116-32I dPCR	IMG-116-46
Q116-31I	imegen-Quimera Q116-31I dPCR	IMG-116-45
Q116-30D	imegen-Quimera Q116-30D dPCR	IMG-116-44
Q116-29D	imegen-Quimera Q116-29D dPCR	IMG-116-43
Q116-27D	imegen-Quimera Q116-27D dPCR	IMG-116-41
Q116-24I	imegen-Quimera Q116-24I dPCR	IMG-116-38

Tabla 7. Referencias kits imegen-Quimera para dPCR

7. Aplicación de seguimiento de pacientes

Imegen ha diseñado y desarrollado una aplicación de fácil manejo que le permite al usuario crear una base de datos de pacientes, así como, registrar los resultados del screening de polimorfismos informativos, las cuantificaciones del polimorfismo informativo de las distintas muestras del seguimiento de un paciente y las acciones médicas aplicadas a dicho paciente durante su seguimiento. Además, el usuario podrá visualizar todas las acciones médicas y la evolución del paciente sobre un gráfico, además de exportar los resultados.

Ponemos a su disposición un vídeo tutorial del uso de nuestra aplicación imegen-Quimera, en el siguiente enlace: <https://youtu.be/K38cV3hacm8>

