

Instrucciones de uso

imegen[®] Quimera Screening Multiplex Plus II

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

REF IMG-116-25

Fabricado por:
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. 4 13/11/2019



AEMPS (N° 2019 09 0061 EN)

Página 1 de 20



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 II para dPCR 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: tech.support@imegen.es

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

Modificaciones de las Instrucciones de Uso [IFU]	
Versión 02	Cambio introducido: Adaptación a los requisitos del Reglamento [UE] 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i> .
Versión 03	Cambio introducido: Especificación en apartado 3 de la cantidad de ADN necesaria para llevar a cabo el análisis.
Versión 08	Actualización de la sección Troubleshooting

Índice

1. Información general	4
2. Uso previsto	6
3. Características técnicas	7
4. Advertencias y precauciones	9
5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	10
6. Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran	11
7. Protocolo de ensayo	14
7.1 Preparación de los reactivos	14
7.2 Preparación de las reacciones de amplificación	14
7.3 Configuración del programa de la PCR a tiempo real	15
8. Análisis de los resultados	17
9. Troubleshooting	19
10. Limitaciones	20
10.1 Equipos	20
10.2 Reactivos	20
10.3 Estabilidad del producto	20

1. Información general

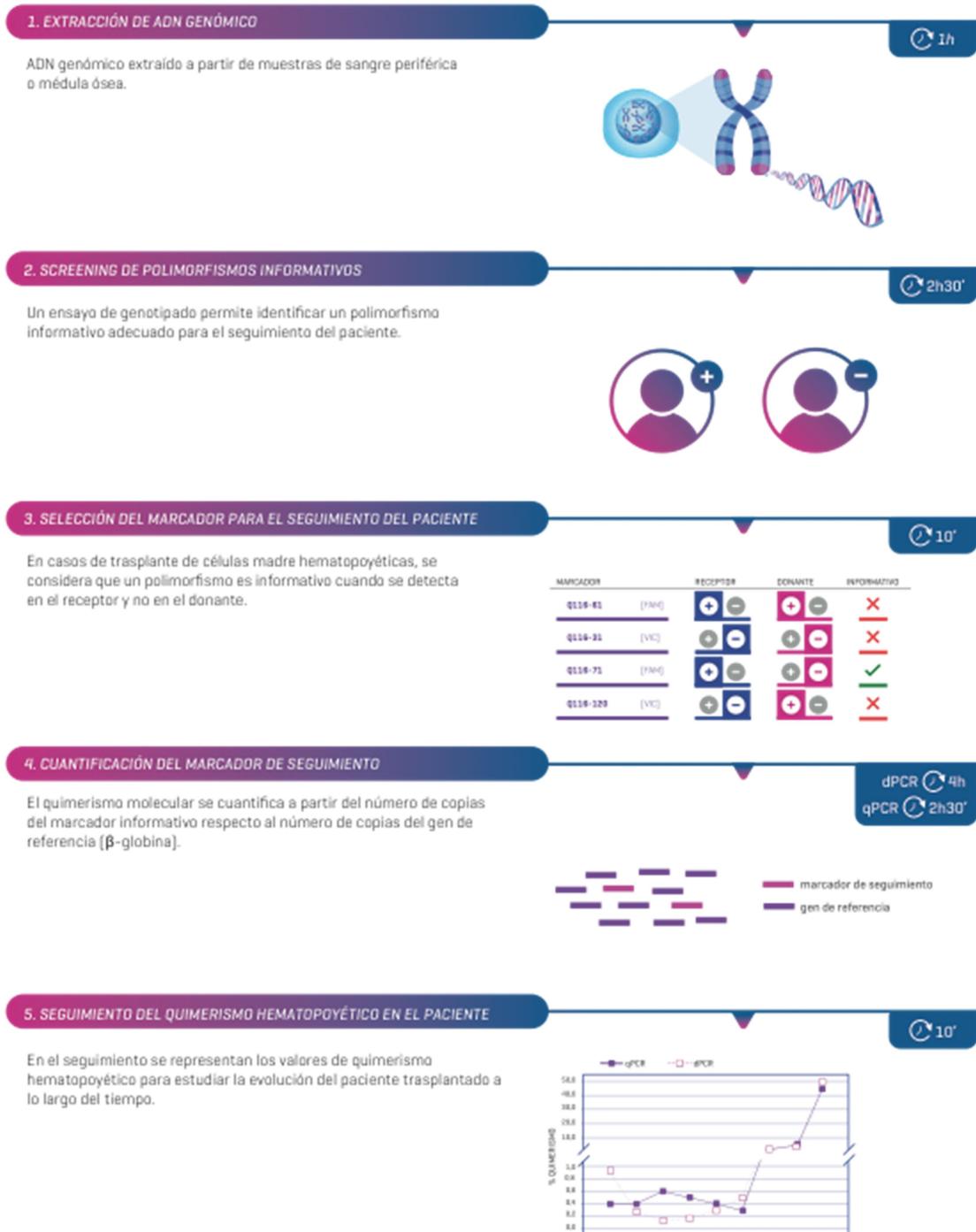
El análisis de quimerismos moleculares resultantes de un trasplante alogénico se ha convertido en un método bien establecido para controlar la evolución del trasplante, puesto que ofrece una información precisa y valiosa que permite orientar el tratamiento o intervención posteriores al trasplante, con el objetivo de anticipar un posible riesgo de recaída, rechazo o enfermedad de injerto contra huésped. Tal aproximación es de gran utilidad no sólo para determinar el riesgo de recaída, rechazo o enfermedad de injerto contra huésped, sino también para evaluar la respuesta a diferentes modalidades de tratamiento.

Toda la familia de kits imegen-Quimera ha sido desarrollada 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.

Referencias

- Jiménez-Velasco A, Barrios M, Román-Gómez J, Navarro G, Buño I, Castillejo J, et al. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia*. 2005; 1-8.
- Stahl T, Böhm M, Kröger N, Fehse B. Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Experimental Hematology*. 2015; 43:462-468.

Procedimiento de análisis de quimerismos hematopoyéticos:



2. Uso previsto

El kit imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II permite la selección de marcadores informativos para el seguimiento de pacientes con trasplante de médula ósea mediante el análisis simultáneo de 16 polimorfismos de inserción/delección [INDELS] en 8 reacciones independientes por PCR multiplex a tiempo real.

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]. Se considera que un polimorfismo es informativo cuando se detecta en el receptor del trasplante y no en el donante.

En este panel se incluye el marcador RhD para los casos en los que no se dispone de la información del Rh del receptor y del donante. Para determinar la informatividad del marcador SRY no es necesario hacer un análisis molecular. El marcador SRY es informativo cuando el receptor es varón.

El kit imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II es sólo para uso diagnóstico in vitro y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

3. Características técnicas

El kit imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II consiste en un ensayo de genotipado de 16 biomarcadores, incluyendo alelos nulos e INDELS [inserción-delección] que permite identificar marcadores informativos para el análisis de quimerismos hematopoyéticos. Junto con imegen-Quimera Screening Multiplex Plus y el marcador SRY, presente en el Chr Y, incluye de un total de 33 marcadores.

Emplea una combinación de oligonucleótidos específicos y sondas de hidrólisis fluorescentes para detectar la presencia o ausencia de 16 marcadores polimórficos multiplexados.

33 marcadores en 19 cromosomas

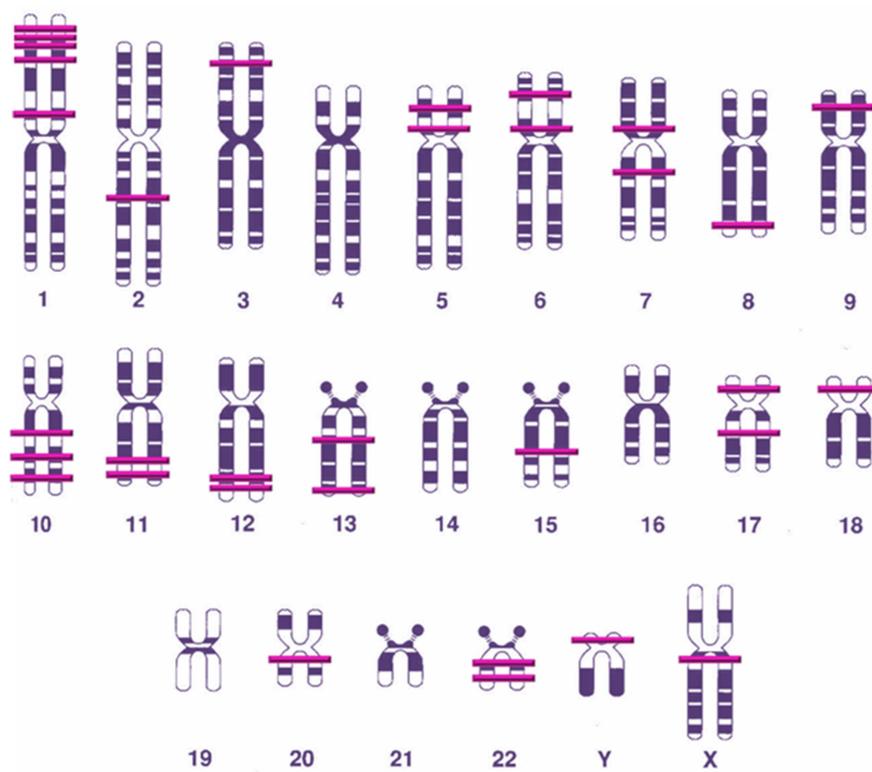


Figura 1. Representación cromosómica de los biomarcadores incluidos en los ensayos de genotipado y seguimiento de quimerismos.

El material necesario para este estudio es ADN genómico procedente, principalmente, de sangre periférica. La cantidad total de ADN necesario es 450 ng de muestra de receptor pre-trasplante y 450 ng de muestra de donante.

IMG-116-26 Screening Multiplex Plus

Nombre del Biomarcador	Posición Cromosómica
3I	20q11.22
6I	10q26.2
12D	5p13.2
7I	Xq28
11I	1p13.3
5I	10q21.2
4I	17p13.2
10I	22q13.32
23I	13q34
28I	12q24.23
32I	3p25.3
31I	6p21.2
29D	17q21.31
30D	7q21.3
27D	18p11.22
24I	1p34.1

IMG-116-25 Screening Multiplex Plus II

Nombre del Biomarcador	Posición Cromosómica
33I	1p36.13
37I	5p15.32
38I	6p12.3
44I	13q14.11
43I	12q24.21
49I	2q21.2
39I	7p12.3
50I	1p36.11
45I	15q21.3
9I	22q11.22
41I	10q23.33
20I	8q24.22
46I	9p23
47I	11q23.2
42I	11q22.3
RhD	1p36.11

Tabla 1. Posición cromosómica de los biomarcadores. El marcador SRY está también disponible, localizado en Chr Y.

El funcionamiento clínico de este kit ha sido validado empleando ADN genómico extraído a partir de sangre periférica o médula ósea de muestras humanas. El límite de detección se ha establecido en 0.01% cuando se utilizan muestras de ADN genómico.

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

Imegen está certificada frente a la norma UNE-EN ISO 13485:2018 Productos Sanitarios: Sistemas de Gestión de Calidad - Requisitos para fines reglamentarios por la AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS para el Diseño, desarrollo y producción de productos sanitarios para diagnóstico in vitro:

- Kits de análisis genético
- Software para análisis bioinformático de datos genéticos

4. Advertencias y precauciones

1. Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
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 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.
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 [MSDS] de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
8. 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.
9. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
10. 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.
11. El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por imegen.
12. El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por imegen, por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.

5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para analizar 10 muestras diferentes de ADN genómico, o 5 casos receptor/donante.

El kit consta de una tira de 8 tubos que contiene un Máster de Screening 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.

Tubo	Reacciones	Marcadores	Conservación	Rehidratación
1	10 Reacciones	Q116-33I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-37I		
2	10 Reacciones	Q116-38I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-44I		
3	10 Reacciones	Q116-43I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-49I		
4	10 Reacciones	Q116-39I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-50I		
5	10 Reacciones	Q116-9I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-45I		
6	10 Reacciones	Q116-20I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-41I		
7	10 Reacciones	Q116-46I	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-47I		
8	10 Reacciones	RhD	4°C	33 µL de agua/vial*
		Q116-42I		

Tabla 2. Componentes del kit imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II y temperatura de conservación

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

6. Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real
- Micropipetas [10 μ L, 20 μ L y 200 μ L]
- Vortex

Reactivos:

- Agua libre de nucleasas
- Master Mix 2X [ADN Polimerasa HotStart]

Materiales:

- Placas ópticas de 96 pocillos o tubos ópticos de 0.2 mL
- Film óptico para placa de 96 pocillos o tapas ópticas para tubos de 0.2 mL
- Puntas de pipetas con filtro [10 μ L, 20 μ L y 200 μ L]
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Guantes de látex sin polvo

6.1 Kits complementarios

Como kit complementario, si imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II no identificase ningún marcador informativo, se recomendaría el uso de imegen-Quimera Screening Multiplex Plus el cual ofrece 16 nuevos marcadores [REF: IMG-116-26].

Una vez se ha identificado un polimorfismo como informativo, recomendamos adquirir el kit correspondiente de imegen-Quimera para dPCR de nuestro catálogo, para llevar a cabo el seguimiento del paciente y, por tanto, el análisis del órgano trasplantado y la evaluación del riesgo de recaída. Los kits imegen-Quimera permiten cuantificar de manera absoluta la cantidad de marcador informativo [quimerismo] o de manera relativa en relación a la cantidad total de ADN genómico, empleando un gen de referencia [β -globina]. El gen de referencia se analiza simultáneamente con el marcador informativo en una reacción multiplexada, además sirve como control de la calidad y cantidad de la muestra de ADN analizada.

Nombre del kit	Referencia
imegen-Quimera SRY dPCR	IMG-116-27
imegen-Quimera RhD dPCR	IMG-116-28
imegen-Quimera Q116-3I dPCR	IMG-116-29
imegen-Quimera Q116-4I dPCR	IMG-116-30
imegen-Quimera Q116-5I dPCR	IMG-116-31
imegen-Quimera Q116-6I dPCR	IMG-116-32
imegen-Quimera Q116-7I dPCR	IMG-116-33
imegen-Quimera Q116-11I dPCR	IMG-116-34
imegen-Quimera Q116-10I dPCR	IMG-116-35
imegen-Quimera Q116-12D dPCR	IMG-116-36
imegen-Quimera Q116-23I dPCR	IMG-116-37
imegen-Quimera Q116-24I dPCR	IMG-116-38
imegen-Quimera Q116-20I dPCR	IMG-116-40
imegen-Quimera Q116-27D dPCR	IMG-116-41
imegen-Quimera Q116-28I dPCR	IMG-116-42
imegen-Quimera Q116-29D dPCR	IMG-116-43
imegen-Quimera Q116-30D dPCR	IMG-116-44
imegen-Quimera Q116-31I dPCR	IMG-116-45
imegen-Quimera Q116-32I dPCR	IMG-116-46
imegen-Quimera Q116-33I dPCR	IMG-116-47
imegen-Quimera Q116-9I dPCR	IMG-116-48
imegen-Quimera Q116-37I dPCR	IMG-116-49
imegen-Quimera Q116-38I dPCR	IMG-116-50
imegen-Quimera Q116-39I dPCR	IMG-116-51
imegen-Quimera Q116-41I dPCR	IMG-116-52
imegen-Quimera Q116-42I dPCR	IMG-116-53
imegen-Quimera Q116-43I dPCR	IMG-116-54
imegen-Quimera Q116-44I dPCR	IMG-116-55
imegen-Quimera Q116-45I dPCR	IMG-116-56
imegen-Quimera Q116-47II dPCR	IMG-116-57
imegen-Quimera Q116-49I dPCR	IMG-116-58

Nombre del kit	Referencia
imegen-Quimera Q116-50I dPCR	IMG-116-59
imegen-Quimera Q116-46II dPCR	IMG-116-60

Tabla 3. Kits imegen-Quimera dPCR para seguimiento por PCR digital

7. Protocolo de ensayo

7.1 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 33 μL de agua libre de nucleasas/vial*. 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.

* Si estos reactivos no van a usarse tras su rehidratación, recomendamos conservarlos a -20°C.

7.2 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 marcadores con el kit imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II requiere la preparación de ocho mixes diferentes de PCR. Cada mix de PCR estará formado por:

- Máster Mix del Screening Multiplex
- Máster Mix PCR 2x [no incluido en el kit]

El protocolo recomendado para preparar las reacciones de amplificación es el siguiente:

1. Descongelar la tira de 8 tubos que contiene los Masters de Screening y el ADN del receptor y del donante. Agitar con vortex 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 25 ng/ μL en un tubo de 1.5mL.
3. Añadir 45 μL de Máster Mix de PCR 2X y 18 μL de ADN del donante a 25 ng/ μL en un tubo de 1.5mL.
4. Agitar con vortex 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.

7.3 Configuración del programa 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 seguir las siguientes instrucciones para configurar el programa de amplificación:

Tubo	Marcadores	Inserción (Alelo +)	Delección (Alelo -)	Marcaje	Emisor o Quencher
1	Q116-33I	X		FAM™	MGB
	Q116-37I	X		VIC®	
2	Q116-38I	X		FAM™	
	Q116-44I	X		VIC®	
3	Q116-43I	X		FAM™	
	Q116-49I	X		VIC®	
4	Q116-39I	X		FAM™	
	Q116-50I	X		VIC®	
5	Q116-9I	X		FAM™	
	Q116-45I	X		VIC®	
6	Q116-20I	X		FAM™	
	Q116-41I	X		VIC®	
7	Q116-46I	X		FAM™	
	Q116-47I	X		VIC®	
8	RhD	X		FAM™	
	Q116-42I	X		VIC®	

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

7500 Fast o StepOne Plus 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®:
- Programa óptimo:

Campos	Etapa 1 Activación enzimática	Etapa 2 PCR	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	50 ciclos	
		Desnaturalización	Unión de cebadores / 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 Plus

* *Detección de la fluorescencia*

Lightcycler 480 [Roche]

- Programa óptimo:

Campos	Etapa 1 Activación enzimática	Etapa 2 PCR			Etapa 3
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	50 ciclos			1 ciclo final
		Desnat	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*

- Analisis: Fit points para todas las muestras

8. 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.

A continuación, se muestra una tabla con los posibles resultados:

Reactivos	Resultados		Informatividad	
	Receptor	Donante	Médula Ósea	Órgano sólido
Polimorfismo	+	+	No informativo	No informativo
Polimorfismo	+	-	Informativo	No informativo
Polimorfismo	-	-	No informativo	No informativo
Polimorfismo	-	+	No informativo	Informativo

Tabla 6. Interpretación de los posibles resultados obtenidos con imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II

En caso de no haber obtenido ningún marcador informativo, contactar con el servicio técnico [tech.support@imegen.es].

A continuación se muestra una figura en la que se ejemplifica el resultado de dos marcadores multiplexados. El marcador marcado con VIC sería informativo en caso de trasplante de médula ósea, pero no en trasplante de órgano sólido, tal y como se indica en la Tabla 6.

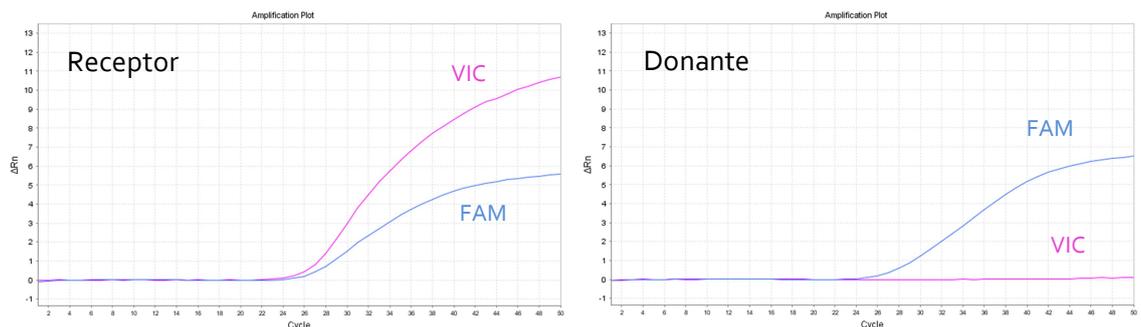


Figura 2. Resultados obtenidos en 7500 FAST Real-time PCR System para muestras de receptor y donante. Dos marcadores genéticos se multiplexan en cada reacción de PCR. Las curvas de amplificación azules representan la señal de amplificación en el canal FAM y las curvas de amplificación rosas representan la señal de amplificación en el canal VIC.

9. Troubleshooting

La tabla que aparece a continuación presenta gráficamente los resultados que podrían obtenerse del análisis de los diferentes controles positivos y negativos y de una muestra de ADN genómico en un ensayo, así como su interpretación y la razón más probable que causa dicho resultado:

Control	C _T Polimorfismo	Resultado	Causa
Muestra analizada	Detectado < 30	+	Resultado esperado
	Detectado > 30	+	Contaminación de la PCR con ADN humano ¹ , o concentración de la muestra inferior a la especificada en el protocolo ²
	No detectado	-	Resultado esperado
Control Negativo de PCR	No detectado	-	Resultado esperado
	Detectado	+	Contaminación de la PCR con ADN humano ¹

Tabla 7. Posibles resultados de los controles y muestras

¹ Contaminación de la PCR con ADN : la contaminación de las reacciones de PCR puede deberse a un error en el proceso de manejo de la muestra, contaminación de los reactivos o contaminación ambiental. Limpie a fondo el laboratorio donde se realizó el proceso de PCR, así como el equipo. Si es necesario, use nuevas alícuotas de los reactivos utilizados en la PCR y repita el ensayo.

² Concentración de la muestra inadecuada : una amplificación tardía de los marcadores puede deberse a que la concentración de ADN utilizada en el ensayo sea inferior a la especificada por el protocolo. En ese caso, se recomienda cuantificar la muestra de nuevo mediante absorbancia o fluorescencia. Si es necesario, use nuevas alícuotas de los reactivos utilizados en la PCR y repita el ensayo.

10. Limitaciones

10.1 Equipos

imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II ha sido validado usando las siguientes plataformas de PCR a tiempo real:

- 7500 FAST Real-Time PCR System [ThermoFisher Scientific]
- StepOne Plus Real-Time PCR System [ThermoFisher Scientific]
- LightCycler 480 [Roche]

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

10.2 Reactivos

imegen-Quimera Screening Multiplex Plus II ha sido validado utilizando los reactivos incluidos en el kit. Se recomienda utilizar los reactivos de PCR recomendados por el proveedor del termociclador que se vaya a utilizar para los ensayos de PCR a tiempo real, como se indica en el apartado 6 [Equipos y materiales necesarios que no se suministran en el kit]. 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.