



imegen



Instrucciones de uso

Imegen[®] HFE

REF **IMG-218**

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. 5 27/01/2020



AEMPS [Nº 2019 09 0061 EN]



Página 1 de 18



imegen

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 uso en 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[®] 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:

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 04	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 05	Modificación del control positivo. Inclusión de controles heterocigotos de ADN genómico. Cambio aplica del lote 21820C004 en adelante.



imegen

Índice

1. Información general	4
2. Uso previsto	5
3. Características técnicas	5
4. Advertencias y precauciones de seguridad	6
5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	7
6. Equipos y materiales necesarios que no se suministran	8
7. Protocolo de ensayo	9
7.1 Preparación de las reacciones de amplificación	9
7.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real	10
8. Análisis de los resultados	12
9. Troubleshooting	17
10. Limitaciones	18
10.1 Equipos	18
10.2 Reactivos	18
10.3 Estabilidad del producto	18



1. 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

- <https://www.omim.org/entry/613609>



imegen

2. Uso previsto

El kit **imegen-HFE** emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes en un ensayo de PCR a tiempo real validado para detectar los alelos patogénicos que dan lugar a las variantes p.His63Asp, p.Ser65Cys y p.Cys282Tyr (NM_000410.3:c.187C>G; c.193A>T y c.845G>A, respectivamente) y el alelo normal del gen *HFE* en tres sistemas de PCR. Además, utiliza como controles positivos muestras de ADN genómico que presentan las mutaciones diana en heterocigosis.

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

3. Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando muestras analizadas previamente por el servicio de genética médica de imegen y ADN sintético con una única copia de las secuencias diana (normal o mutantes) de las regiones objeto de análisis del gen *HFE*, 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 150 ng.

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



imegen

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

- **HFE282 Master Mix:** Contiene oligonucleótidos, sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM y VIC) y agua para la amplificación y detección de los alelos normal y mutante (p.Cys282Tyr) objeto de análisis.
- **HFE63 Master Mix:** Contiene oligonucleótidos, sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM y VIC) y agua para la amplificación y detección de los alelos normal y mutante (p.His63Asp) objeto de análisis.
- **HFE65 Master Mix:** Contiene oligonucleótidos, sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM y VIC) y agua para la amplificación y detección de los alelos normal y mutante (p.Ser65Cys) objeto de análisis.
- **General Master Mix:** Master Mix de PCR con los nucleótidos, MgCl₂, enzima y buffer necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real.
- **Positive Controls:** Controles positivos heterocigotos para cada una de las dianas del ensayo.

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	4°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



imegen

6. Equipos y materiales no suministrados

Equipos:

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

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

6.1 Kits complementarios

Para el análisis de genotipado de dianas relacionadas con enfermedades hematológicas, y en concreto, con alteraciones en el proceso de coagulación, imegen 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-MTHFR II (ref. IMG-216) e 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.



7. Protocolo de ensayo

7.1 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:

1. Descongelar todos los reactivos del kit y el ADN de las muestras.
2. Agitar cada uno de los reactivos en vortex y mantener en frío.
3. En tubos de 1.5 mL preparar los tres mix de PCR añadiendo los siguientes reactivos por muestra:

Reactivos	Cantidad por reacción		
	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

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

- 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

- 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.

7.2 Configuración del programa de 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	Receptor	Genotipado	Quencher
HFE282	HFE282-G-P	VIC®	Normal	MGB
	HFE282-A-P	FAM™	Mutante	MGB
HFE63	HFE63-C-P	VIC®	Normal	MGB
	HFE63-G-P	FAM™	Mutante	MGB
HFE65	HFE65-A-P	VIC®	Normal	MGB
	HFE65-T-P	FAM™	Mutante	MGB

Tabla 2. Información de las sondas



imegen

- Programa óptimo de PCR:

Campos	Etapa 1 Lectura Pre-PCR	Etapa 2 Activación enzimática	Etapa 3 PCR		Etapa 4 Lectura Post-PCR
Nº de Ciclos	1 ciclo	1 ciclo	50 ciclos		1 ciclo
			Desnaturalización	Unión de oligonucleótidos/ Extensión	
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 Scientific)

**Detección de la fluorescencia*

8. Análisis de resultados

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

- Comprobar que en los controles negativos de PCR no hay amplificación, ni en el canal FAM ni en el canal VIC.
- Comprobar que en los controles positivos 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**.

SISTEMA HFE282:

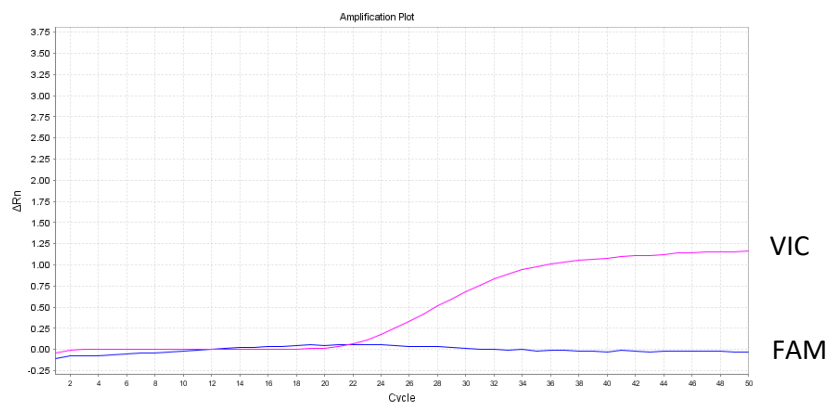


Figura 2. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal (G/G). Sólo se observa amplificación en el canal VIC.

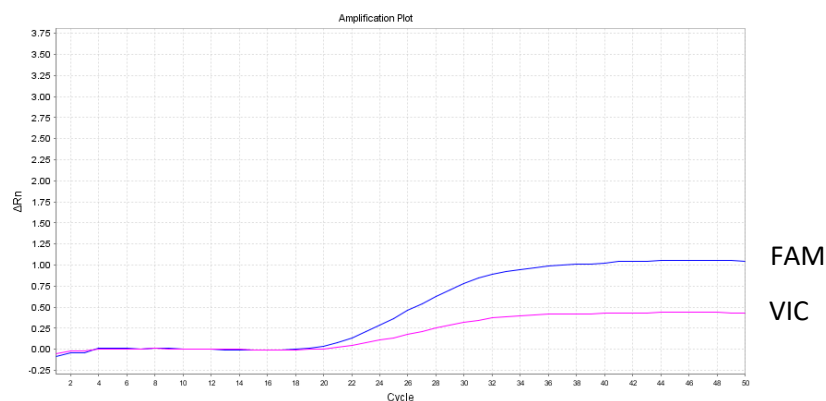


Figura 3. Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (G/A). Se observa señal en ambos canales, FAM y VIC, siendo la intensidad de fluorescencia mayor en el canal FAM.

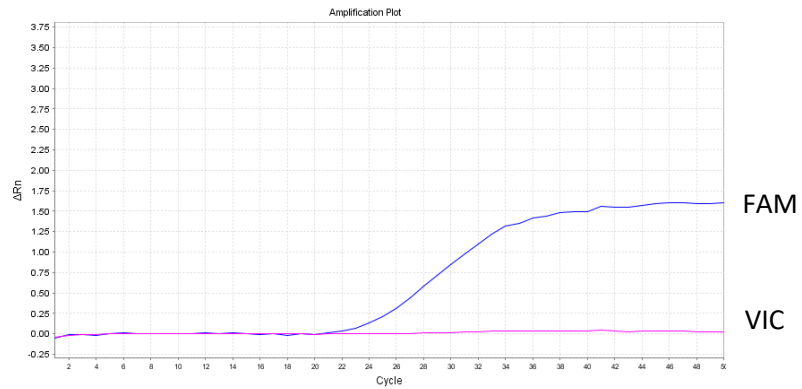


Figura 4. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (A/A). Solo se observa amplificación en el canal FAM.

SISTEMA HFE63:

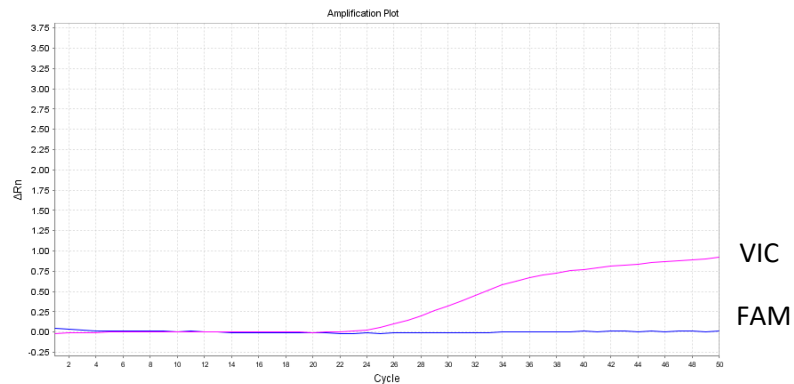


Figura 5. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal (C/C). Sólo se observa amplificación en el canal VIC.

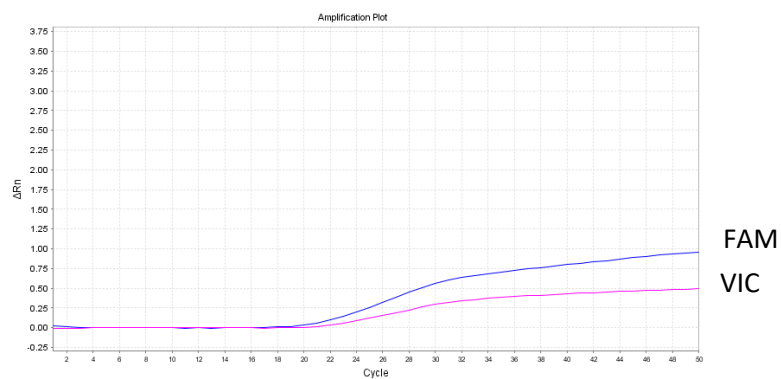


Figura 6. Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (C/G). Se observa señal en ambos canales, FAM y VIC, siendo la intensidad de fluorescencia mayor en el canal FAM.

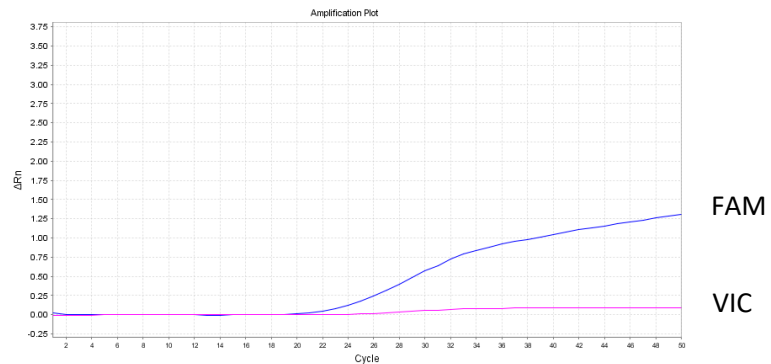


Figura 7. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (G/G). Solo se observa amplificación en el canal FAM.

SISTEMA HFE65:

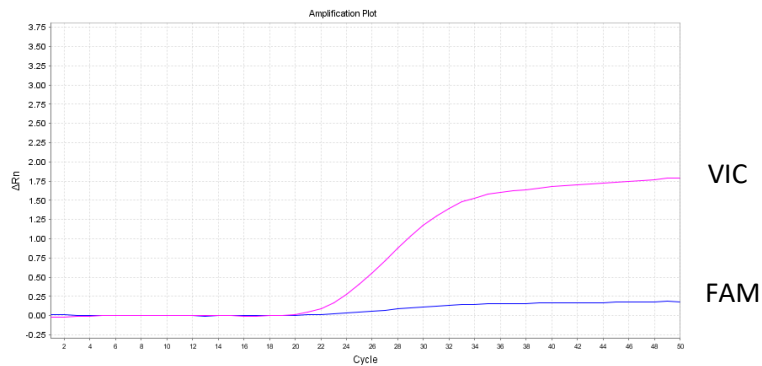


Figura 8. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal (A/A). Se observa amplificación en el canal VIC y una leve señal residual en el canal FAM.

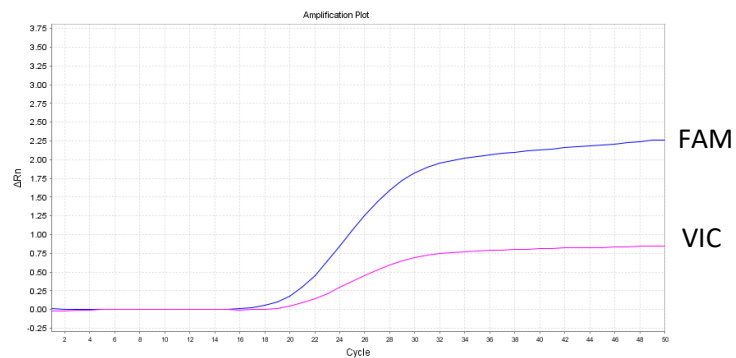


Figura 9. Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (A/T). Se observa señal en ambos canales, FAM y VIC, siendo la intensidad de fluorescencia mayor en el canal FAM.

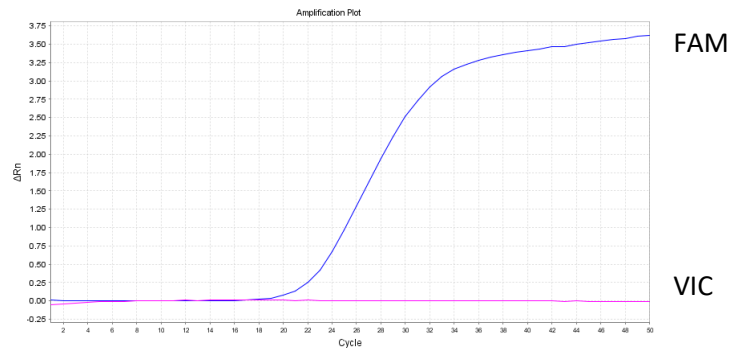


Figura 10. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (T/T). Solo se observa amplificación en el canal FAM.

GRÁFICOS DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA:

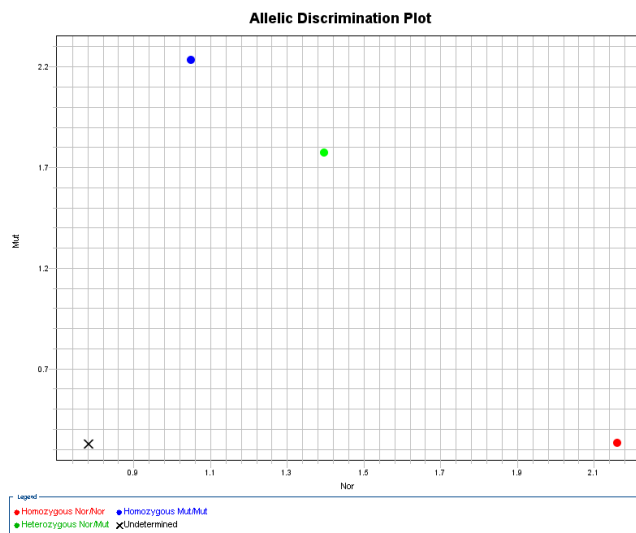


Figura 11. Gráfico de discriminación alélica con el sistema HFE282

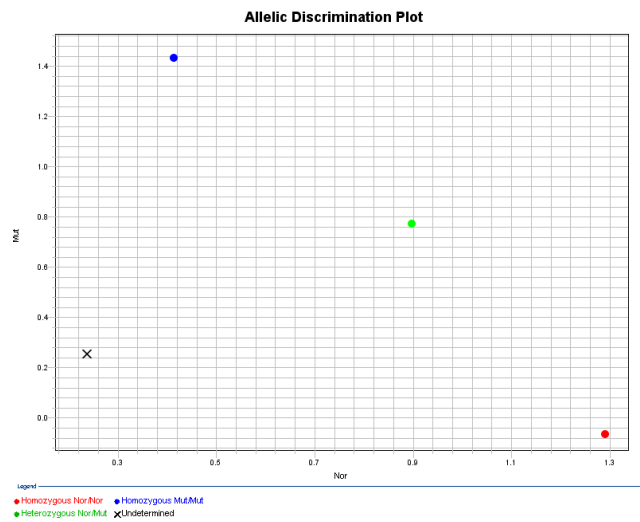


Figura 12. Gráfico de

discriminación alélica con el sistema HFE63

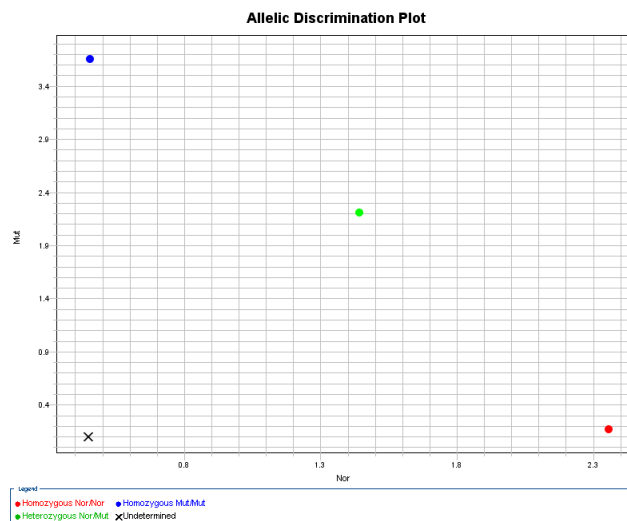


Figura 13. Gráfico de discriminación alélica con el sistema HFE265



9. 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 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 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 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.



imegen

10. Limitaciones

10.1 Equipos

imegen-HFE ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- 7500 FAST Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
- StepOne Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
- StepOne Plus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)

Si usa otra marca o modelo de termocicladores, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro servicio 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 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.