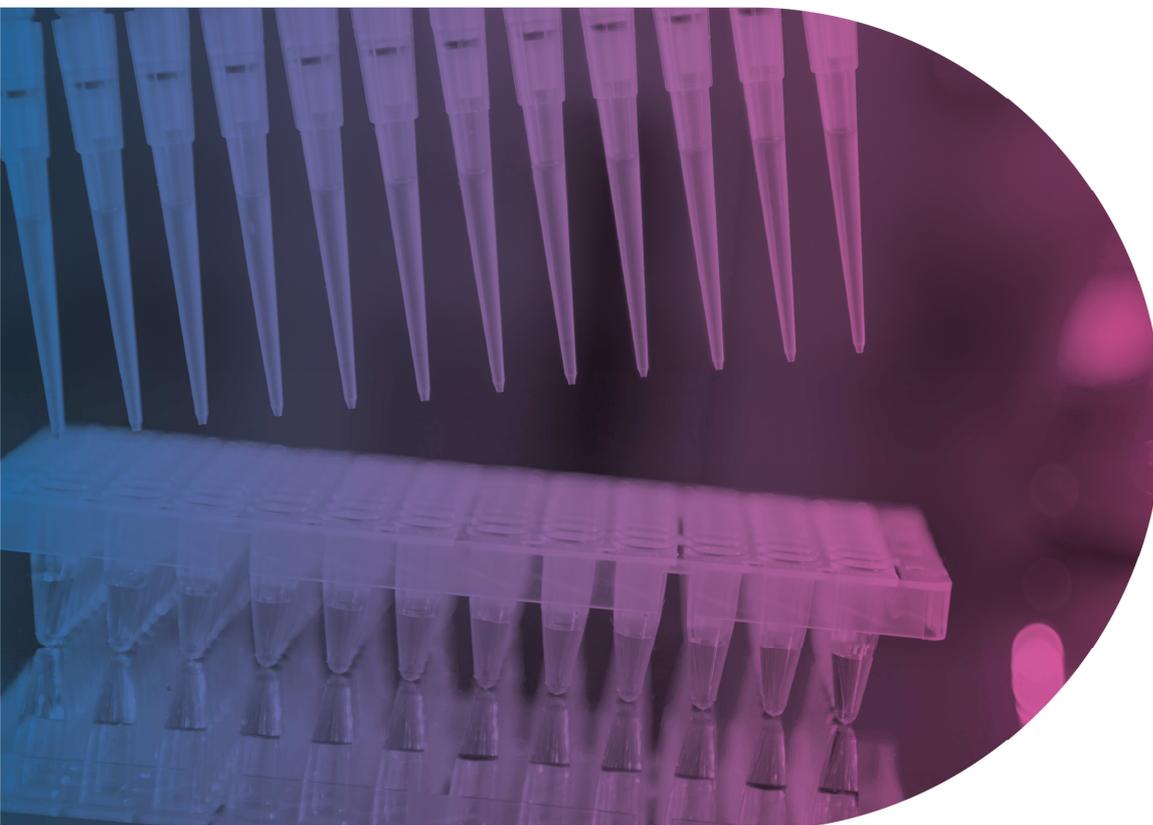




imegen



Instrucciones de uso

Imegen[®] SCAs

REF

IMG-152

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



AEMPS (N° 2019 09 0061 EN)



Rev. 5 28/02/2020



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 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. **Imegen-SCAs** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

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 03 | 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 04 | Actualización de los rangos de referencia del número de repeticiones. |
| Versión 05 | Revisión del contenido. |



imegen

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Información general | 4 |
| 2. Uso previsto | 6 |
| 3. Características técnicas | 7 |
| 4. Advertencias y precauciones de seguridad | 8 |
| 5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit | 9 |
| 6. Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran | 11 |
| 7. Protocolo de ensayo | 12 |
| 7.1 Preparación de las reacciones de amplificación | 12 |
| 7.2 Preparación de la placa de fragmentos | 14 |
| 7.3 Electroforesis capilar | 14 |
| 8. Análisis de los resultados | 16 |
| 8.1 Resultados de TP-PCR | 18 |
| 9. Troubleshooting | 20 |
| 10. Limitaciones | 22 |
| 10.1 Equipos | 22 |
| 10.2 Reactivos | 22 |
| 10.3 Estabilidad del producto | 22 |

1. Información general

Las ataxias espinocerebelosas [SCAs] comprenden un gran grupo, heterogéneo, de desórdenes neurodegenerativos caracterizados fundamentalmente por ataxia cerebelar progresiva con anomalías motoras, disartria, síntomas piramidales y extrapiramidales, retinopatía pigmentaria, neuropatía periférica y disfunción cognitiva entre otros síntomas.

Este grupo de enfermedades presenta un patrón de herencia autosómico dominante. Hasta la fecha, han sido identificados 40 tipos de SCAs, clasificados del SCA1 al SCA40.

La prevalencia de los SCAs en la población general ha sido estimada del 0.001-0.005%. La frecuencia de cada SCA varía en las distintas poblaciones, siendo los más frecuentes SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA12 y SCA17.

Han sido descritos distintos genes asociados con esta patología, cuya mutación consiste generalmente, en la expansión de la repetición CAG. Excepto en el caso de SCA17 que se caracteriza con la expansión de los trinucleótidos CAG y CAA. Por tanto, el diagnóstico de SCAs se lleva a cabo por la identificación del número de repeticiones del trinucleótido que genera la expansión.

| Ataxia | Gen | Localización cromosómica | N° de repeticiones | | | |
|------------------------------------|----------------|--------------------------|------------------------------------|----------------|------------------------|--|
| | | | Alelo normal | Alelo incierto | Penetrancia intermedia | Penetrancia completa, patológico |
| SCA1 ¹ (MIM#164400) | <i>ATXN1</i> | 6p22.3 | 6–38; 39–44 CAT interrumpido | | - | 39–44 CAGs ininterrumpido; 45–91 |
| SCA2 ¹ (MIM#183090) | <i>ATXN2</i> | 12q24.13 | 14–31 | 32–34 | - | 35–500 |
| SCA3 ¹ (MIM#109150) | <i>ATXN3</i> | 14q32.12 | 11–44 | - | 45–59 | 60–87 |
| SCA6 ¹ (MIM#183086) | <i>CACNA1A</i> | 19p13.13 | 4–18 | - | 19 | 20–33 |
| SCA7 ¹ (MIM#164500) | <i>ATXN7</i> | 3p14.1 | 4–19 | 28–33 | 34–35 | 36–460 |
| SCA12 ¹ (MIM#604326) | <i>PPP2R2B</i> | 5q32 | 4–32 | 40–45 | - | 51–78 |
| SCA17 ² (MIM#607136) | <i>TBP</i> | 6q27 | 25–40 | - | 41–48 | > 49 |
| DRPLA ³ (MIM#125370) | <i>ATN1</i> | 12p13 | 6–35 | 36–47 | - | ≥ 48 |

Tabla 1. Rangos de referencia del número de repeticiones de las SCAs analizadas mediante Imegen-SCAs.



imegen

Adicionalmente, el kit **imegen-SCAs** incluye el análisis de la atrofia dentatorubral-pallidoluysian [DRPLA] porque es un trastorno neurodegenerativo que muestra similitudes con las SCA, como el tipo de herencia [autosómica dominante], el tipo de mutación [expansión de un trinucleótido CAG] y algunos síntomas [principalmente ataxia cerebelar].

Referencias

- ¹ SCA Base. Reference ranges for oligonucleotide repeat sizes at the main SCA loci. <http://www.scabase.eu/table3.php>
 - ² Toyoshima Y, Onodera O, Yamada M, Tsuji S, Takahashi H. Spinocerebellar Ataxia Type 17 [Internet]. GeneReviews®. University of Washington, Seattle; 1993. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301611>
 - ³ Veneziano L, Frontali M. DRPLA [Internet]. GeneReviews®. University of Washington, Seattle; 1993. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301664>
- Sun Y-M, Lu C, Wu Z-Y. Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype - a review. Clin Genet. 2016;90: 305–314.



imegen

2. Uso previsto

Mediante el uso del kit **imegen-SCAs** se pueden analizar las expansiones de tripletes CAG o CAG/CAA asociados a ataxias cerebelosas y a la atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA) mediante PCR convencional y electroforesis capilar. Además, el kit ofrece un sistema de TP-PCR [triplet repeat primed PCR] para detectar las expansiones mayores de SCA2 y SCA7, no detectables con la PCR convencional.

El ensayo de TP-PCR emplea un oligonucleótido marcado específico de locus que flanquea la repetición, junto con oligonucleótidos emparejados que amplifican desde múltiples sitios de la expansión, permitiendo por PCR a tiempo final y posterior electroforesis capilar, la detección de los alelos expandidos no detectables por la PCR convencional.

Los productos de PCR serán separados por electroforesis capilar, y tanto la PCR como la TP-PCR serán detectados mediante el marcaje 6-Carboxifluoresceína [6-FAM].

Los resultados proporcionarán al clínico una correlación fenotipo-genotipo, que facilitará el diagnóstico diferencial, predicción del curso de la enfermedad, monitoreo de los síntomas y asesoramiento genético.

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



imegen

3. Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando muestras objeto de análisis del interlaboratorio de EMQN [European Molecular Genetics Quality Network], así como muestras analizadas previamente por el servicio de genética médica de imegen y permite detectar específicamente las expansiones objeto de análisis de este kit.

El material necesario para este estudio es ADN genómico procedente, principalmente, de sangre periférica. La cantidad total de ADN necesario es 50 ng para cada sistema de amplificación.

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.



imegen

5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 12 determinaciones. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- Ataxia A Master Mix: Master Mix de PCR con las cantidades de nucleótidos, betaína, $MgCl_2$ y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones: Pocillos A, B, C, D, E y F de la tira SCAs Master Mix.
- Ataxia B Master Mix: Master Mix de PCR con las cantidades de nucleótidos, betaína, $MgCl_2$ y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de PCR: Pocillos G y H de la tira SCAs Master Mix y de TP-PCR.
- General Master Mix III: DNA polimerasa necesaria para llevar a cabo las reacciones de PCR: Pocillos A, B, C, D, E y F de la tira SCAs Master Mix.
- General Master Mix IV: DNA polimerasa necesaria para llevar a cabo las reacciones de PCR: Pocillos G y H de la tira SCAs Master Mix y de TP-PCR.
- TP SCA2 y TP SCA7 Master Mix: Contiene los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo las TP-PCRs incluidas en el kit.
- Positive Control: ADN genómico a la concentración óptima de amplificación en el que se encuentran presentes alelos normales para todos los análisis llevados a cabo con el kit. [Ver genotipo en el apartado 8 de este documento].
- Tira SCAs Master Mix: La tira de 8 pocillos contiene los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la amplificación por PCR convencional de las regiones diana del kit. Ver disposición de cada Master Mix específico en tabla 2.

| POCILLO | SCA Master Mix |
|---------|----------------|
| A | SCA1 |
| B | SCA3 |
| C | SCA6 |
| D | SCA12 |
| E | SCA17 |
| F | DRPLA |
| G | SCA2 |
| H | SCA7 |

Tabla 2. Distribución cada Master Mix específico en la tira de 8 pocillos

| Reactivos | Color | Cantidad | Conservación |
|------------------------|--------------------|-----------|--------------|
| Ataxia A Master Mix | Disco Blanco | 720 µl | -20°C |
| Ataxia B Master Mix | Disco Amarillo | 710 µl | -20°C |
| General Master Mix III | Tapa Blanca | 360 µl | -20°C |
| General Master Mix IV | Tapa Amarilla | 10 µl | -20°C |
| Tira SCAs Master Mix | Tira de 8 pocillos | 8 x 60 µl | -20°C |
| TP SCA2 Master Mix | Disco Verde | 60 µl | -20°C |
| TP SCA7 Master Mix | Disco Morado | 60 µl | -20°C |
| Positive Control | Tapa Azul | 200 | -20°C |

Tabla 3. Contenido del kit imegen-SCAs



imegen

6. Equipos, reactivos y materiales no suministrados

Equipos:

- Termociclador convencional
- Micropipetas (10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL)
- Pipeta multicanal (0.5-10 µL)
- Vortex
- Centrífuga
- Equipo de electroforesis capilar

Reactivos:

- GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystems cat. no. 4322682)
- Hi-Di™ formamide
- Agua libre de nucleasas

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Tubos de 0.2 mL
- Placas de 96 pocillos compatibles con el equipo de electroforesis capilar
- Film para placas de 96 pocillos
- Guantes de látex

Nota: Este kit no incluye los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo la electroforesis capilar.

6.1 Kits complementarios

Para el análisis de expansiones implicadas en otras enfermedades neurodegenerativas, imegen también ofrece los kits imegen-DM1 [Ref: IMG-173], imegen-SBMA [Ref: IMG-153], imegen-Huntington [Ref: IMG-154], imegen-Friedreich [Ref: IMG-155]. Todos ellos junto con el kit imegen-SCAs, han sido diseñados usando el mismo programa de PCR, por lo que se pueden analizar conjuntamente.



7. Protocolo de ensayo

7.1 Preparación de las reacciones de amplificación

El kit **imegen-SCAs** ha sido diseñado para llevar a cabo 10 reacciones por cada muestra que se desea analizar [8 de PCR y 2 de TP-PCR] para un total de 12 determinaciones.

En cada ensayo se recomienda añadir un control negativo de PCR para comprobar que los reactivos empleados no están contaminados con ADN y un control positivo que permita comprobar el funcionamiento de todos los sistemas de amplificación y normalizar el resultado obtenido en base al tamaño del fragmento obtenido para cada tipo de análisis.

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.

Se prepararán 2 mixes distintos, uno para las reacciones de PCR de SCA1, SCA3, SCA6, SCA12, SCA17 y DRPLA [Mix A], y otro para las reacciones de PCR de SCA2, SCA7 y TP-PCR de SCA2 y SCA7 [Mix B]. A continuación se muestra el protocolo recomendado para la preparación de las reacciones de amplificación:

1. Descongelar todos los reactivos y el ADN de las muestras. Agitar en vortex cada uno de los reactivos y mantener en frío.
2. En un tubo de 1.5 mL, preparar el Mix A de PCR añadiendo los siguientes reactivos. Agitar en vortex y dar un spin.

| Reactivos | Cantidad por muestra |
|------------------------|-----------------------------|
| Ataxia A Master Mix | 60 µL |
| General Master Mix III | 30 µL |

3. En un tubo de 1.5 mL, preparar el Mix B de PCR y TP-PCR añadiendo los siguientes reactivos. Agitar en vortex y dar un spin.

| Reactivos | Cantidad por muestra |
|-----------------------|-----------------------------|
| Ataxia B Master Mix | 59.2 µL |
| General Master Mix IV | 0.8 µL |



4. En una placa de 96 pocillos dispensar 15 μL del Mix A a los pocillos correspondientes a las filas A, B, C, D, E y F de la placa. Habrá que rellenar tantas columnas como número de muestras o controles se vayan a analizar simultáneamente.
5. De la misma manera, dispensar 15 μL del Mix B a los pocillos correspondientes a las filas G y H de la placa para las reacciones de PCR de SCA2 y SCA7. Habrá que rellenar tantas columnas como número de muestras o controles se vayan a analizar simultáneamente.
6. Una vez dispensados los mixes para las reacciones de PCR, dispensar 15 μL del Mix B a los pocillos en los que se deseen llevar a cabo las reacciones de TP-PCR de los SCA2 y SCA7.
7. Con una pipeta multicanal, añadir 5 μL de los Master-Mix específicos de cada SCA incluidos en la tira de 8 pocillos del kit a cada columna según el número de muestras o controles.
8. Añadir 5 μL de los Master Mix específicos de cada TP-PCR (TP SCA2 Master Mix y TP SCA7 Master Mix) a los pocillos donde se vayan a llevar a cabo estas reacciones.
9. Añadir 5 μL de las muestras diluidas a una concentración de 10 ng/ μL a cada pocillo o 5 μL de agua si se trata de un control negativo de PCR o 5 μL del control positivo, el cual ya se encuentra a la concentración óptima de amplificación.
10. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de amplificación:

| Campos | Etapa 1 Activación enzimática | Etapa 2 PCR o TP-PCR | | | Etapa 3 | |
|--------------|-------------------------------------|-------------------------|--------------------|-----------|--|-----|
| | | Desnaturalización | Unión de cebadores | Extensión | Finalización de la PCR o TP-PCR y conservación | |
| Nº de Ciclos | 1 ciclo inicial | 30 ciclos | | | 1 ciclo | |
| Temperatura | 94°C | 94°C | 60°C | 72°C | 72°C | 4°C |
| Tiempo | 5 minutos | 1 minuto | 1 minuto | 2 minutos | 10 minutos | ∞ |

Tabla 4. Programa de PCR y TP PCR, óptimo para los equipos T3 de Biometra, SimpliAmp Thermal Cycler y GENEAMP® PCR System 2720 de Applied Biosystems

Es posible detener el protocolo en este punto. Los productos de PCR pueden almacenarse a 4°C si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas o a -20°C para periodos de tiempo superiores.

7.2 Preparación de la placa de fragmentos

Para llevar a cabo la electroforesis capilar, hay que preparar los productos de PCR y TP-PCR [fragmentos] en una placa de 96 pocillos compatible con el equipo de electroforesis capilar, tal y como se indica a continuación:

1. Añadir a un tubo de 1.5 mL los siguientes reactivos:

| Reactivos | Cantidad por reacción |
|----------------------------|------------------------------|
| Formamida | 18 µL |
| Marcador GeneScan™ 500 LIZ | 0.5 µL |

Recomendamos realizar los cálculos considerando una reacción más, o bien, incrementando en un 10% el volumen de cada reactivo.

Nota: El volumen del marcador de tamaño puede ser aumentado o disminuido para ajustar la intensidad de los picos observados en el electroferograma.

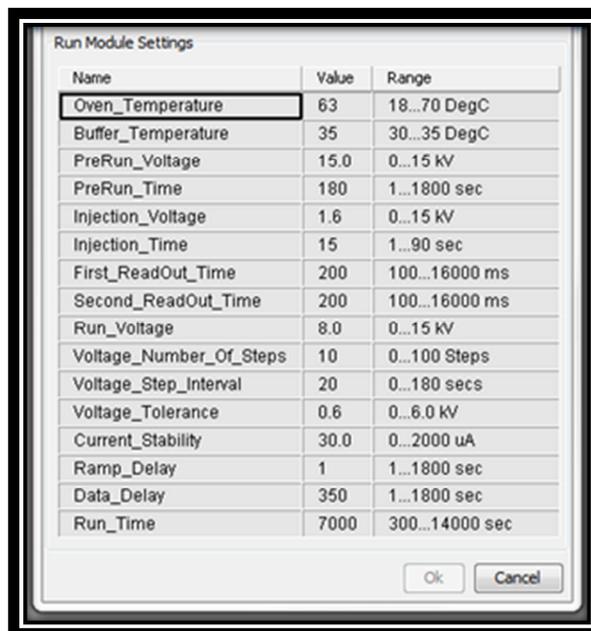
2. Dispensar 18.5 µL de la mezcla anterior en cada pocillo.
3. Añadir 1 µL del ADN obtenido en las reacciones de PCR y TP-PCR.
Nota: El volumen de muestra puede ser aumentado o disminuido [diluyendo las muestras con agua libre de nucleasas] para ajustar la intensidad de los picos observados en el electroferograma.
4. Sellar la placa con un film, dar un spin y desnaturalizar en un termociclador durante 5 minutos a 98°C.
5. Guardar a 4°C la placa hasta el momento de introducirla en el secuenciador.

7.3 Electroforesis capilar

Una vez preparada la placa de fragmentos, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Dependiendo del modelo de secuenciador utilizado, se emplearán las condiciones de electroforesis recomendadas por el fabricante.

Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que el rango de amplificación varía aproximadamente entre 100-500 pb, que se emplean cebadores marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScan™ 500 LIZ.

A continuación se muestra una imagen con las condiciones optimizadas para el secuenciador 3730xl DNA Analyzer [ThermoFisher Scientific], usando el polímero POP-7™.



| Name | Value | Range |
|-------------------------|-------|-----------------|
| Oven_Temperature | 63 | 18...70 DegC |
| Buffer_Temperature | 35 | 30...35 DegC |
| PreRun_Voltage | 15.0 | 0...15 kV |
| PreRun_Time | 180 | 1...1800 sec |
| Injection_Voltage | 1.6 | 0...15 kV |
| Injection_Time | 15 | 1...90 sec |
| First_ReadOut_Time | 200 | 100...16000 ms |
| Second_ReadOut_Time | 200 | 100...16000 ms |
| Run_Voltage | 8.0 | 0...15 kV |
| Voltage_Number_Of_Steps | 10 | 0...100 Steps |
| Voltage_Step_Interval | 20 | 0...180 secs |
| Voltage_Tolerance | 0.6 | 0...6.0 kV |
| Current_Stability | 30.0 | 0...2000 uA |
| Ramp_Delay | 1 | 1...1800 sec |
| Data_Delay | 350 | 1...1800 sec |
| Run_Time | 7000 | 300...14000 sec |

Figura 1. Parámetros optimizados para el secuenciador 3730xl DNA

La intensidad de la detección puede variar entre los distintos equipos, dependiendo del modelo, del estado del sistema óptico del equipo y del tiempo y voltaje de inyección. Por ello, puede ser necesario, aumentar o disminuir la cantidad de marcador de tamaño o de producto de PCR requeridos para llevar a cabo la electroforesis capilar.

8. Análisis de resultados

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

- Para analizar las muestras hay que emplear un *software* específico y el fichero .fsa obtenido como resultado de la electroforesis capilar.
- Comprobar que en el control negativo de PCR no hay presencia de picos de 130-300 pares de bases en el electroferograma. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el ensayo para descartar que se haya producido una contaminación accidental.
- Análisis de las muestras:

Para calcular el número de repeticiones de un alelo desconocido se puede emplear la siguiente fórmula:

$$\text{Número Repeticiones} = \frac{\text{Tamaño}_{\text{Alelo } X} - X}{3}$$

Siendo X diferente para cada uno de los sistemas.

| SCAs | X pb |
|-------|------|
| SCA1 | 139 |
| SCA2 | 97 |
| SCA3 | 160 |
| SCA6 | 96 |
| SCA7 | 248 |
| SCA12 | 123 |
| SCA17 | 127 |
| DRPLA | 112 |

Tabla 5. Valor de X a aplicar en cada sistema de PCR

Nota: El valor de X procede de una conversión del tamaño de amplicón obtenido con los oligonucleótidos diseñados para este kit, confirmado tanto *in silico*, como en nuestros laboratorios durante la validación del kit.

Debido a las variaciones descritas de una repetición entre distintos laboratorios, desde Imegen recomendamos el uso de una muestra con una repetición de tamaño conocido, usando la siguiente fórmula [Ejemplo: 8 repeticiones].

$$\text{Número Repeticiones} = \frac{\text{Tamaño}_{\text{Alelo } X} - \text{Tamaño}_{\text{Alelo } 8 \text{ rep}}}{3} + 8$$

A continuación se muestran unas imágenes como ejemplo de los posibles resultados.

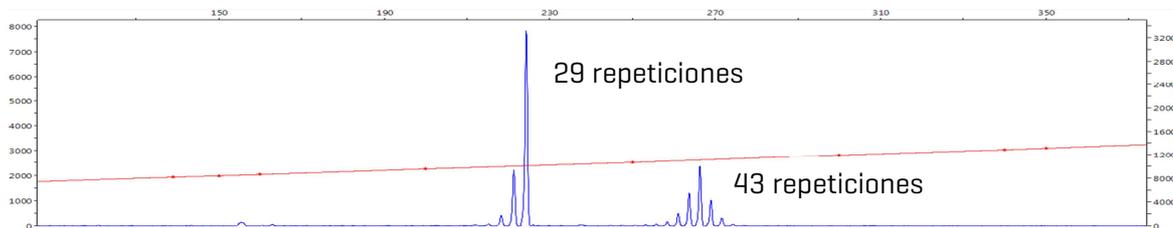


Figura 2. Muestra con un alelo normal y un alelo expandido para el sistema SCA1

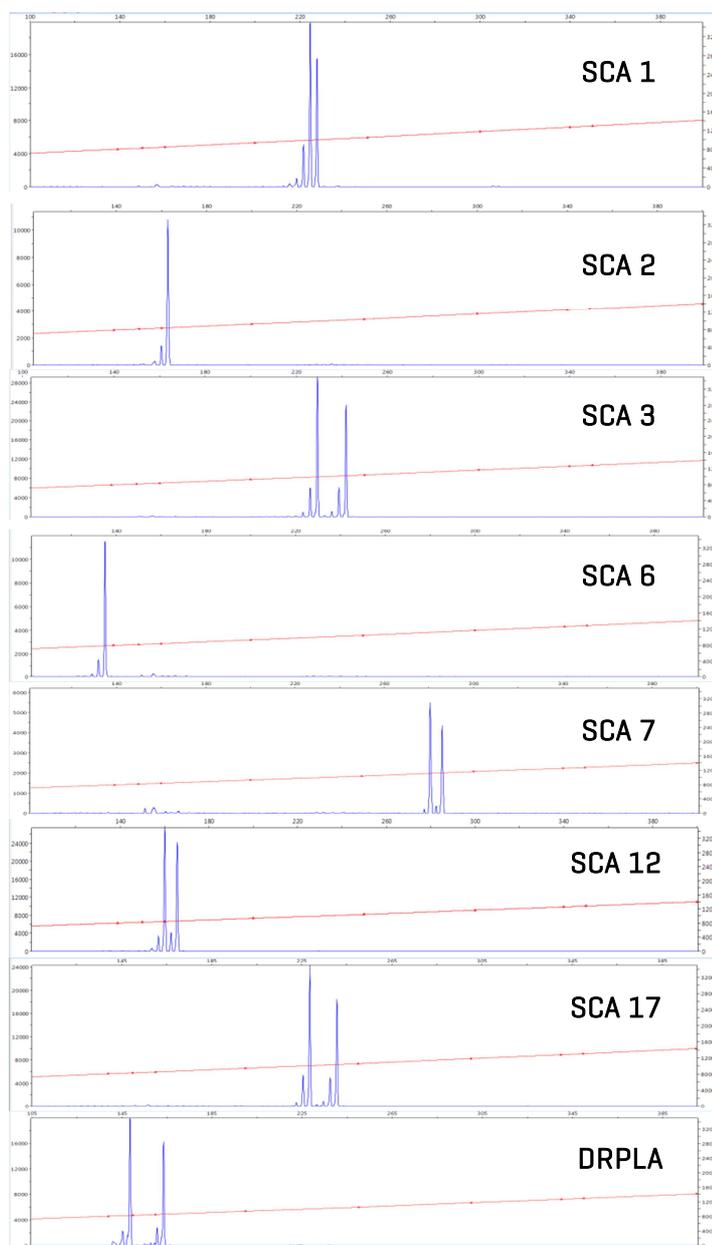


Figura 3. Resultados esperados con el control positivo para cada uno de los sistemas de PCR incluidos en el kit

| Sistema | n° pares de bases | | n° repeticiones | |
|---------|-------------------|-----|-----------------|----|
| SCA1 | 226 | 229 | 29 | 30 |
| SCA2 | 163 | 163 | 22 | 22 |
| SCA3 | 229 | 241 | 23 | 27 |
| SCA6 | 135 | 135 | 13 | 13 |
| SCA7 | 281 | 287 | 11 | 13 |
| SCA12 | 159 | 165 | 12 | 14 |
| SCA17 | 229 | 241 | 34 | 38 |
| DRPLA | 148 | 163 | 12 | 17 |

Tabla 6. Repeticiones y tamaño de los alelos del control positivo en cada sistema

Debido a la presencia de restos de cebadores marcados no consumidos durante la PCR y TP-PCR y a dímeros de primers, se pueden detectar picos inespecíficos, pero siempre fuera del rango de análisis, por lo que no interfieren con la buena interpretación de los resultados. Además, estos picos nunca presentarán las características de los picos debidos a repeticiones en tándem de trinucleótidos: presencia de un pico real de tamaño mayor, y uno o varios picos de tartamudeo, siempre inferiores al real y separados de éste por tres pares de bases.

8.1 Resultados de TP-PCR

Es necesario evaluar los resultados de la TP-PCR (Triplet Repeat primed Polymerase Chain Reaction) en aquellas muestras donde se esté analizando SCA2 y SCA7 y sólo se haya observado un alelo (un pico) en el electroferograma resultante de la PCR de SCA2 y SCA7. Por tanto, la TP-PCR permite diferenciar las muestras homocigotas para alelos normales, de las muestras con alelos expandidos que no pueden ser detectados por PCR convencional, debido a su gran tamaño.

Esta técnica permite la detección de expansiones de cualquier tamaño, aunque la identificación del alelo de mayor tamaño generalmente no permite la determinación del número de repeticiones.

A continuación, se muestran una serie de imágenes como ejemplo del resultado obtenido para una muestra con alelo expandido y una muestra sin expansión para los dos sistemas analizados por TP-PCR.

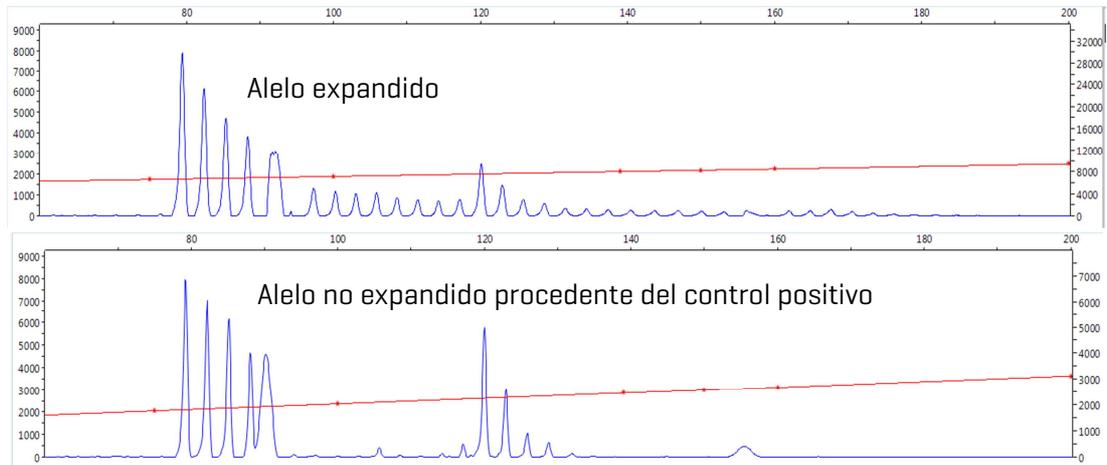


Figura 4. Alelos expandidos y no expandidos para el sistema de TP-PCR de SCA2

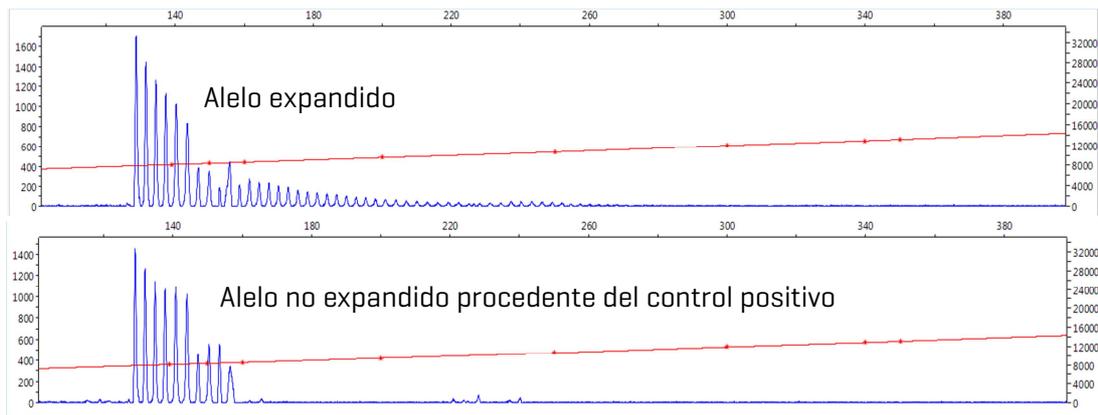


Figura 5. Alelos expandidos y no expandidos para el sistema de TP-PCR de SCA7



9. Troubleshooting

La tabla siguiente representa los resultados que podrían ser obtenidos en las muestras analizadas, el control positivo, el marcador de tamaño y el control negativo. En caso de obtener un resultado inesperado, la interpretación y la razón más probable de dicho resultado se muestran en la siguiente tabla.

| Problema | Muestras analizadas | Positivo control | Marcador de tamaño | Control negativo | Resultados / Interpretación |
|---|---------------------|------------------|--------------------|------------------|---|
| Señal de fluorescencia débil o nula | | | | √ | Resultado esperado |
| | √ | | | √ | Cantidad y/o calidad del ADN molde insuficiente ¹ ADN molde impuro ² |
| | √ | √ | √ | √ | Fallo en la electroforesis capilar ³ Fallo en la desnaturalización ⁴ |
| | √ | √ | | √ | Fallo en la PCR ⁵ |
| Señal de fluorescencia excesiva | √ | | | | Cantidad excesiva de ADN ⁶ |
| | √ | √ | | | |
| Presencia de más picos de los esperados | √ | √ | | √ | Contaminación ⁷ |
| | √ | | | | Contaminación ⁷ Mosaicismo ⁹ |
| | √ | √ | | | Artefactos característicos de las expansiones ⁸ |

Tabla 7. Interpretación de los posibles resultados con el kit imegen-SCAs

¹ **Cantidad y/o calidad de ADN molde insuficiente:** Comprobar que el ADN ha sido correctamente cuantificado y usar la cantidad indicada de ADN molde. En caso de que el ADN haya sido correctamente cuantificado, comprobar su integridad y llevar a cabo una nueva extracción si es necesario.

² **ADN molde impuro:** Altas concentraciones de sales o un pH alterado pueden inhibir la PCR. Si usa un ADN molde disuelto en un tampón de elución con un pH diferente de 8 o con concentraciones altas de EDTA, el volumen de ADN no debería exceder el 20% del volumen total de la reacción. Restos de los reactivos usados durante la extracción también pueden afectar a la reacción de PCR. Si es así, limpie el ADN o prepare una nueva extracción.

³ **Fallo en la electroforesis capilar:** Revise si los parámetros del equipo son los especificados y reinyecte las muestras.



imegen

- ⁴ **Fallo en la desnaturalización:** Para una correcta desnaturalización las muestras deben ser calentadas el tiempo indicado en el apartado 7 de este documento, y posteriormente mantener en frío hasta la carga en el secuenciador.
- ⁵ **Fallo en la PCR:** Compruebe que el programa de PCR es el indicado.
- ⁶ **Cantidad excesiva de ADN:** Asegúrese de estar usando la cantidad adecuada de ADN. Si es así, diluya el producto de PCR en agua estéril desionizada y prepare de nuevo la desnaturalización y carga en el secuenciador.
- ⁷ **Contaminación:** Puede ser producida por otro ADN molde o por un ADN previamente amplificado. La contaminación cruzada puede dar lugar a falsos positivos y negativos, derivando todo ello en problemas en la interpretación de los resultados. Use puntas de pipeta con filtro y cambie los guantes regularmente.
- ⁸ **Artefactos característicos de las expansiones:** La amplificación de expansiones genera artefactos que aparecen como picos más pequeños, y alejados 3 pares de bases del pico predominante.
- ⁹ **Mosaicismo:** En algunos SCAs, como el SCA2 y el SCA6, han sido descritos casos de mosaicismo, por lo tanto es posible, aunque poco probable, encontrar más de un genotipo en una muestra. En este caso aconsejamos repetir la PCR, y en caso de obtener el mismo patrón, utilizar una nueva muestra del paciente, a ser posible de otro tejido [ej. mucosa bucal].



imegen

10. Limitaciones

10.1 Equipos

Imegen-SCAs ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- SimpliAmp Thermal Cycler [ThermoFisher Scientific]
- GeneAmp PCR System 2720 [ThermoFisher Scientific]
- T3000 Thermocycler 48 [Biometra]

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.

Imegen-SCAs ha sido validado usando la siguiente plataforma de secuenciación:

- 3730xl DNA Analyzer [ThermoFisher Scientific]

Este kit es válido para los polímeros compatibles con el marcaje 6-Carboxifluoresceina [6-FAM]. En caso de utilizar otro equipo diferente al mencionado anteriormente, seguir las especificaciones del protocolo de dichas plataformas.

10.2 Reactivos

Imegen-SCAs 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].

Para la electroforesis capilar se recomienda emplear los reactivos recomendados por el proveedor del secuenciador: ThermoFisher Scientific.

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.