

MIA FORA™ NGS

MFlex

WORKFLOW MIA FORA

BOLETÍN N° 6

El antígeno leucocitario humano (HLA) es la variante humana del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los genes que codifican moléculas HLA se dividen en el grupo de Clase I y Clase II según su función celular. Las moléculas HLA Clase I (subdivididas en genes pertenecientes a los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C) se expresan en la mayoría de los tipos de células somáticas. Las moléculas HLA Clase II (subdivididas en los loci HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP) solo se expresan en la superficie de ciertos subconjuntos de células inmunes presentadoras de antígenos, células T activadas y en células epiteliales tímicas.

La tipificación HLA para clase I y II es ampliamente empleada y cada vez busca tener una mejor resolución para emitir resultados confiables, y con las mínimas ambigüedades posibles, garantizando así el estudio confiable de los pacientes.

El kit para tipificación HLA I y II de Immucor, MIA FORA MFlex, ofrece un producto de fácil y rápido manejo, con procedimientos estandarizados optimizados, poco equipamiento de laboratorio y un software de análisis robusto y fácil de usar.

COMPONENTES DEL KIT MIA FORA MFLEX

REACTIVOS PARA PCR

- Mezcla maestra premezclada “todo en uno” para cubrir 6 u 11 genes

REACTIVOS DE BIBLIOTECA

- Preparación de librería primaria
- Adaptadores de ligación
- Amplificación de librería

PLACA ADAPTADORA

- Placa de índices de adaptadores previamente dividida en alícuotas
- Índex para 24 o 96 pacientes

KIT DE PERLAS MAGNÉTICAS (componente separado)

- Vial con perlas Agencourt AMPure XP beads

El kit incluye todo lo que se necesita para construir una biblioteca de secuenciación, no es necesario comprar ningún componente por separado.



MFlex 6 96 Test Kit Shown

INSTRUMENTACIÓN NECESARIA PARA MIA FORA MFLEX

Instrumento	Fabricante
Veriti Thermal Cycler*	Applied Biosystems
ProFlex Thermal Cycler	Applied Biosystems
Pippin Prep**	Sage Science
Qubit Fluorometer	Life Technologies
MiSeq/MiniSeq/iSeq /NextSeq	Illumina

Opcional**

OPCIONES PARA SECUENCIACIÓN

El producto ha sido validado en diversas plataformas Illumina como iSeq, MiniSeq, MiSeq y NextSeq lo cual permite que cada laboratorio emplee la plataforma disponible o acorde a su volumen de trabajo.



iSeq
Low Throughput



MiniSeq
Low-Mid Throughput



MiSeq
Low-Mid Throughput



NextSeq
Mid-High Throughput

MIA FORA MFLEX PROTOCOLO

Preparación de la muestra



FLUJO DE TRABAJO MIA FORA MFlex:

El protocolo inicia con la preparación de la muestra según indicaciones del IFU, al tenerla lista, se arranca con la PCR de largo alcance, al finalizarla, se tendrá lista la materia prima para la preparación de la librería, que incluye fragmentación, reparación final y adición de poli A a cada fragmento, todo en un solo paso.

Se continúa con uno paso de limpieza con perlas magnéticas, que vienen incluidas en el kit, para posteriormente añadir los adaptadores, que son pequeños fragmentos de DNA que funcionan como códigos de barras,

que se unen a los fragmentos de cada muestra para poder identificarlas.

Posteriormente al tener las muestras identificadas, se procede a hacer un pool, lo que permite continuar el montaje de todas las muestras en un solo tubo. Al tener el pool, se procede con una segunda fase de limpieza y selección de fragmentos del tamaño requerido para el instrumento en que se vaya a secuenciar, proceso que se puede llevar a cabo con las perlas magnéticas del kit.

Para finalizar, se realiza amplificación de librería previamente construida, cuantificación de la misma, limpieza final y secuenciación, para posteriormente realizar el análisis de los datos.

El flujo de trabajo de MIA FORA MFlex está diseñado para que sea rápido, cómodo y que ocupe poco tiempo de operario, obteniendo así resultados oportunos.

En general, el flujo de trabajo se puede desarrollar a lo largo de tres días, sin que esto implique días completos de ocupación. Así pues, se sugiere la siguiente distribución de proceso:

DIA 1:

PCR de largo alcance: Aquí partimos de muestras de DNA cuantificadas. Se realiza el proceso de preparación de reactivos y adición de muestras, para luego cargar la mezcla en el termociclador y correr el ciclo de PCR que toma alrededor de 4 horas. El tiempo de manipulación no excede los 15- 30 minutos y la PCR queda corriendo durante la noche, optimizando así el día 1 de trabajo.

DIA 2:

El día 2 incluye el proceso de construcción de librería, que como se mencionaba anteriormente, abarca desde la fragmentación, reparación final y adición de poli A hasta que

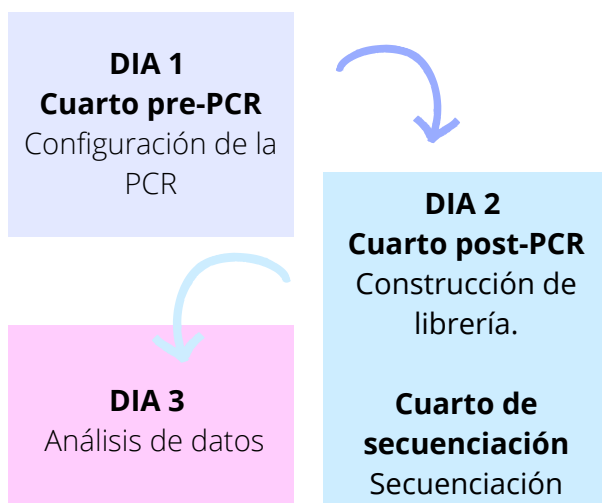
cargamos la librería en el instrumento de secuenciación. El tiempo total del procedimiento está estimado en alrededor de 4-5 horas, pero el tiempo de operario se limita entre 1 o 1,5 horas.

Adicional a la construcción de la librería tenemos el tiempo de secuenciación. En esta fase, el tiempo estimado de operario son 30 minutos, cumplida esta fase, se da inicio al tiempo de secuencia en el instrumento, el cual puede tomar entre 17 y 24 horas para finalizar, es por esto que el paso se inicia finalizando el día, para así contar con la noche para que se realice el proceso.

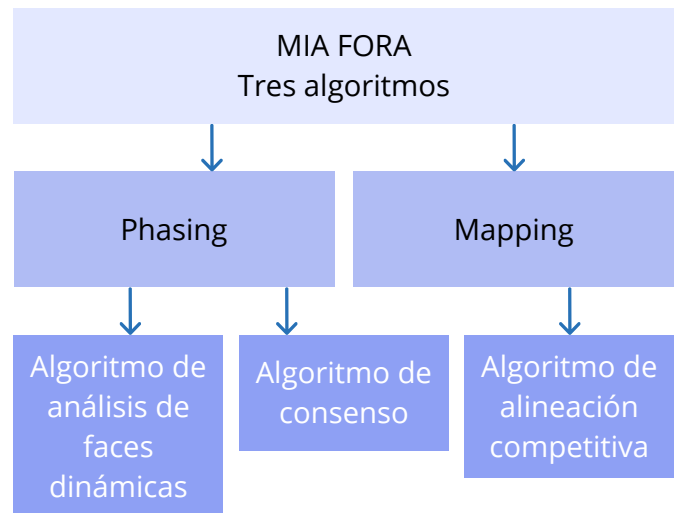
DIA 3

Dependiendo del tiempo de secuencia, el usuario podrá realizar análisis la mañana del tercer día, optimizando así el flujo de trabajo, para continuar con el reporte de los resultados.

TIEMPO DE RESPUESTA TÍPICO



ANÁLISIS



*Exclusivos para MIA FORA. Patente pendiente.

El software de MIA FORA utiliza dos estrategias bioinformáticas complementarias para llevar a cabo el análisis de las muestras. Estas son Phasing y Mapping.

MIA FORA es el único software disponible que utiliza tres algoritmos diferentes para determinar la tipificación HLA de las muestras analizadas, dando como resultado la tipificación más precisa del mercado.

- Mapping: está relacionado con el algoritmo de alineación competitiva, compara y alinea secuencias de extremos emparejados con la secuencia de referencia directamente base por base y encuentra una alineación óptima para cada secuencia leída.
- Phasing: abarca un algoritmo de análisis de fases dinámicas y un algoritmo de consenso empleado ampliamente en el resto de kits disponibles.

El software de MIA FORA entre sus características ofrece una paleta de colores y figuras que facilitan visualmente al análisis y además cuenta con una guía de banderas

inteligentes que ayuda al usuario a realizar un análisis guiado para la obtención de una tipificación confiable.

En caso de estar interesado en nuestros productos NGS Secuencia MIA FORA, por favor ponerse en contacto con su asesor comercial.

VENTAJAS DEL PRODUCTO

RESULTADOS DE CALIDAD:

- Reacción multiplex optimizada
- Resultados en un solo paso
- Cobertura amplia, precisa y completa de todas las principales regiones del gen HLA para mejorar los resultados de los pacientes, disminuyendo las ambigüedades.

FLUJO DE TRABAJO EFICIENTE:

- Eliminación de múltiples pasos - flujo de trabajo optimizado
- Tiempo de operario corto
- Inicio de secuenciación en menos de 24 horas
- Reporte de resultados en menos de 3 días
- Posibilidad de automatización y varias opciones de instrumentos para secuenciación

COSTO EFECTIVO:

- Flexibilidad en la configuración de los corridos
- Múltiples opciones de flujo de trabajo

MIA FORA ENSAYO Y SOFTWARE

