

Conozca acerca de Next Generation Sequencing (NGS)

El término secuenciación de nueva generación (NGS) hace referencia al conjunto de tecnologías que han sido diseñadas y desarrolladas para evaluar y analizar gran cantidad de información contenida en el ADN de forma masiva y paralela (1), facilitando el flujo de trabajo para el usuario.

Referente a su aplicación en la tipificación HLA, frente a otras metodologías como SSP o SSO, la secuenciación de nueva generación permite obtener un mapa preciso de cada loci del gen HLA mediante una secuenciación de un solo nucleótido, generando una lectura de mejor resolución lo que disminuye las ambigüedades que por las otras metodologías son más frecuentes debido a que diferentes loci HLA comparten secuencias de nucleótidos.

Aplicabilidad

A nivel general, la secuenciación de nueva generación es aplicable a muchas ramas como la secuenciación de genomas completos, secuenciaciones profundas de regiones objetivo, secuenciación de muestras de cáncer para estudiar variantes somáticas raras, subclones tumorales, estudiar el microbioma humano o identificar nuevos patógenos etc.

En cuanto a la secuenciación de nueva generación y el HLA, esta permite determinar el tipaje HLA a nivel alélico (4 dígitos) de pacientes candidatos a trasplante de progenitores hematopoyéticos, registro de donantes voluntarios, registro y verificación de unidades de sangre de cordón umbilical, confirmatorio pre-trasplante de donante y receptor entre otros (2).

Por otro lado, el uso de NGS en la tipificación de HLA en los programas de trasplante de órganos sólidos permite la identificación de la resolución a nivel de alelo del receptor y los donantes, lo que puede ser beneficioso para la interpretación de la aparición de anticuerpos DSA después del trasplante, que se identifican a nivel de alelo (3).

Además, es útil para la tipificación de poblaciones lo que permite tener bases de datos que mejoren el conocimiento de las mismas apoyando también la asociación con algunas enfermedades o permitiendo el estudio para aplicación de terapias ligadas al HLA.

Antígeno leucocitario humano (HLA)

El antígeno leucocitario humano (HLA) es la variante humana del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (4). 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 (4).

Tipificación HLA

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 Werfen, MiaFora MFlex ofrece un producto de fácil y rápido manejo. Este cuenta con procedimientos estandarizados optimizados, poco equipamiento de laboratorio y un software de análisis robusto y fácil de usar.

Componentes del kit MiaFora MFlex

Reactivos para PCR

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

Kit perlas magnéticas (por separado)

- Vial con perlas Agencourt AMPure XP beads.



Reactivos de biblioteca

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

Placa adaptadora

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



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

Instrumentación necesaria

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.

Protocolo

1. Preparación de la muestra
2. PCR de largo alcance
3. Preparación primaria
4. Limpieza con perlas

5. Selección de tamaño
6. Preparación del pool y limpieza con perlas
7. Ligación del adaptador
8. Amplificación de librería + cuantificación
9. Limpieza con perlas
11. Secuenciación
12. Análisis de datos

Flujo de trabajo

El protocolo inicia con la preparación de la muestra, siguiendo las indicaciones del IFU. Una vez lista, se procede con la PCR de largo alcance. Al finalizar esta etapa, se obtiene la materia prima necesaria para la preparación de la librería, que incluye la fragmentación, reparación terminal y adición de poli-A a cada fragmento, todo en un solo paso.

A continuación, se realiza una limpieza utilizando perlas magnéticas incluidas en el kit. Luego, se añaden los adaptadores, pequeños fragmentos de ADN que actúan como códigos de barras, permitiendo identificar los fragmentos de cada muestra. Una vez identificadas, las muestras se agrupan en un único pool, lo que permite continuar el proceso en un solo tubo. Con el pool formado, se lleva a cabo una segunda fase de limpieza y selección de fragmentos del tamaño adecuado para el equipo de secuenciación que se utilizará. Esta etapa también se realiza con las perlas magnéticas del kit. Para finalizar, se amplifica la librería construida, se cuantifica, se realiza una última limpieza y se procede con la secuenciación, seguida del análisis de datos.

El flujo de trabajo de MIA FORA MFlex está diseñado para ser rápido, cómodo y con un tiempo mínimo de intervención por parte del operario, lo que permite obtener resultados de forma oportuna.

En términos generales, el proceso puede completarse en tres días, sin requerir jornadas completas de trabajo. Se sugiere la siguiente distribución del flujo de trabajo:



Día 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.

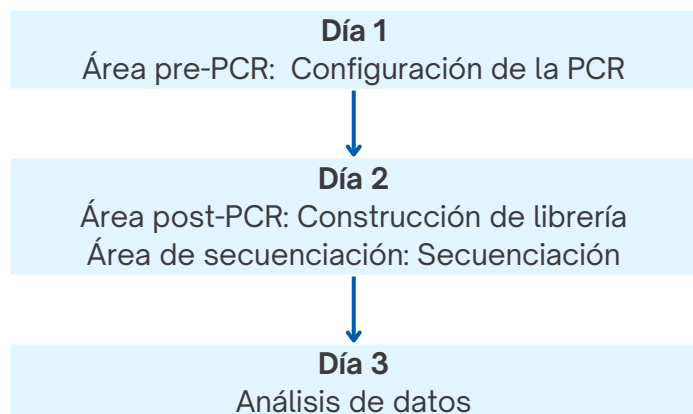
Día 2

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 esta estimado en alrededor de 4-5 horas, pero el tiempo de operario se limita entre 1 o 1,5 horas.

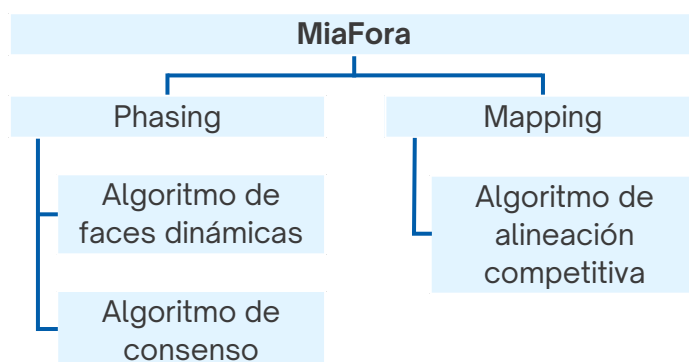
Adicional a la construcción de la librería tenemos el tiempo de secuenciación. En esta fase, el tiempo estimado de operario son 30 minutos, cumplida esta fase, se da inicio al tiempo de secuencia en el instrumento, el cual puede tomar entre 17 y 24 horas para finalizar, es por esto que el paso se inicia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

Día 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.



Análisis



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

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 disminuyendo las ambigüedades.



Flujo de trabajo eficiente

- Eliminación de múltiples pasos.
- Tiempo de operario corto.
- Inicio de secuenciación en menos de 24h.
- Reporte de resultados en menos de 3 días.
- Posibilidad de automatización y opciones de instrumentos para secuenciación.

Costo efectivo

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

En caso de estar interesado en nuestros productos NGS secuenciación MiaFora, por favor ponerse en contacto con su asesor comercial.

Bibliografía

1. Rubio S, Pacheco R, Gómez A, Perdomo S, García R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: Presente y futuro en la práctica clínica. Univ Med [Internet]. 2020;61(2):1-15. Disponible en: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs>
2. Banc de Sang i Teixits. Tipificación HLA-A alta resolución. s.f. [Internet]. Disponible en: <https://www.bancsang.net/es/productos-servicios/pruebas-de-laboratorio/catalogo/35/tipificacion-hla-a-alta-resolucion>
3. Nutrición en diálisis. Inmunobiología de trasplante de órganos. s.f. [Internet]. Disponible en: <https://nutricionendialisis.com/guia/32%20Inmunobiología%20del%20trasplante%20de%20Órganos.pdf>
4. Delves J. Sistema del antígeno leucocitario humano (HLA). [Internet]. 2024. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es/professional/inmunología-y-trastornos-alérgicos/biología-del-sistema-inmunitario/sistema-del-antígeno-leucocitario-humano-hla?ruleredirectid=752>

