



GUÍA PARA EL USUARIO:

Recomendaciones previas para ensayos
nanoString de GeoMX y nCounter.

Índice:

1. Consideraciones para ensayos nanoString (GeoMX y nCounter)	2
2. Ensayos de GeoMx	2
2.1. Portaobjetos	2
2.2. Tipo de tejido	3
2.3. Distribución del tejido en el portaobjetos	3
2.4. Cortes y envío de muestras al laboratorio	3
2.5. Selección de ROI y estudio previo al envío de muestras al laboratorio	4
2.6. Segmentación de los ROI	5
2.7. Tiempos estimados	5
2.8. Confirmación del laboratorio	5
2.9. Realización del ensayo	5
2.9.1. Procesado de las muestras	5
2.9.2. Lectura y carga de datos	6
2.10. QC y acceso a los datos	6
3. nCounter	6
3.1. nCounter. consideraciones previas	6
3.1.1 Requisitos de la muestra	7

1. Consideraciones para ensayos nanoString (GeoMX y nCounter)

Los ensayos de GeoMx requieren un proceso de lectura de datos que, dependiendo de las particularidades del servicio solicitado, se realiza a través de secuenciación (Illumina) o a través de nCounter. Los datos obtenidos de estos procesos de lectura son importados nuevamente en el GeoMx para su análisis.

Los ensayos específicos de nCounter utilizan un procedimiento independiente de lectura y análisis que no está relacionado con el comentario anterior.

Los protocolos de nanoString son actualizados constantemente. Por ello es recomendable que verifique si las condiciones de su experimento inicial deben sufrir algún tipo de modificación debido a la actualización de protocolos. Es conveniente contactar con el laboratorio antes de confirmar la aceptación de servicio o presupuesto para confirmar si ha habido algún cambio en las condiciones iniciales.

Por ejemplo: aumentar o disminuir el área de montaje del tejido en el portaobjetos y por tanto el número de muestras a analizar en el ensayo, o que sea necesario añadir o quitar alguna condición.

Lea atentamente las siguientes recomendaciones.

El laboratorio no es responsable de resultados no satisfactorios consecuencia de no seguir estas recomendaciones.

2. Ensayos de GeoMx

Para realizar un diseño experimental adecuado y la consiguiente aceptación por parte del laboratorio para su ejecución, es necesario que el cliente conozca la siguiente información.

Este esquema representa de forma simplificada el proceso de los ensayos GeoMx:



2.1. Portaobjetos

Las muestras para los ensayos de GeoMx se deben montar en portaobjetos "**SuperFrost Plus**" o con carga positiva para su correcta adhesión.

El uso de cualquier otro tipo de portaobjetos **puede perjudicar a los resultados esperados y provocar la pérdida de tejido durante el ensayo**, por lo que está totalmente desaconsejado por nuestro Laboratorio.

2.2. Tipo de tejido

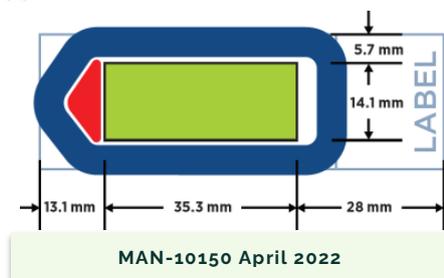
Mezclar tejidos de diferente origen y conservación en un mismo portaobjetos puede perjudicar el experimento.

Si no va a utilizar el mismo tipo de tejido en el ensayo, es muy recomendable que se ponga en contacto con el Laboratorio antes de realizar un diseño de distribución de los tejidos en el portaobjetos.

Si el tejido es de biopsia de aguja o microarray de tejido (TMA), consulte al Laboratorio la viabilidad del ensayo y tamaños mínimos puesto que áreas de tejido demasiado pequeñas también pueden requerir cambios o validaciones en el protocolo e incluso ser descartadas.

2.3. Distribución del tejido en el portaobjetos

Es muy importante que el tejido se encuentre **dentro de la zona indicada en verde** en la siguiente figura del portaobjetos:



Si la distribución del tejido excede la zona recomendada, el Laboratorio se reserva la opción de remover con bisturí el exceso de tejido y no se hace responsable de que esta acción conlleve la pérdida de parte de tejido de interés.

Preste especial cuidado en no solapar diferentes cortes de tejido en el momento de montarlos en el portaobjetos.

2.4. Cortes y envío de muestras al laboratorio

Los cortes deben ser de 5 μm de grosor y deben ser lo más recientes posibles para que haya un **máximo de 5 días desde** su corte al comienzo del ensayo.

El ensayo de GeoMX está validado con el uso de bloques menores a 3 años de antigüedad. Los ensayos con bloques con más de 10 años de antigüedad pueden no obtener resultados significativos.

El Laboratorio llevará a cabo la gestión de la recogida de muestras salvo previo acuerdo con el cliente, por lo que contacte con el laboratorio para coordinar la fecha de los cortes y el envío de las muestras.

Tenga en consideración el punto 2.5 para organizar los cortes que enviará al Laboratorio.

2.5. Selección de ROI y estudio previo al envío de muestras al laboratorio

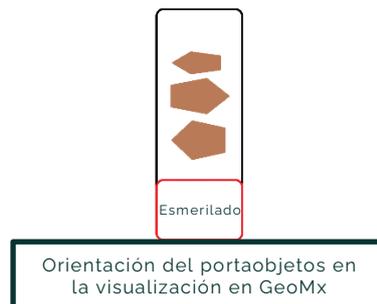
Para garantizar las necesidades en la selección de las Regiones de Interés (ROI), el laboratorio solicitará al cliente las imágenes de los portaobjetos en Hematoxilina-Eosina, e incluso con algún anticuerpo de interés de los cortes adyacentes a los que se enviarán al laboratorio, con la intención de que estos sean lo más representativos de lo que se va a visualizar en el momento del ensayo.

Estas imágenes deben tener la identificación del portaobjeto y la del tejido, así como tener señalado en el tejido las ROI seleccionadas y su correspondiente nomenclatura.

El laboratorio utilizará de apoyo esta documentación para realizar la selección de ROI en la forma más precisa y ajustada al interés del cliente. Para facilitar la interpretación de la ubicación de las ROI, es muy recomendable que las imágenes enviadas sean también a diferente aumento. Primero, con poco aumento para tener una vista general del corte y su orientación. Segundo, con más aumento sobre la región de interés.

Cuanto más claras sean las indicaciones, mayor éxito habrá en la selección de las ROI en el ensayo.

Tenga en cuenta que cuando se realice el ensayo, los portaobjetos estarán orientados con el esmerilado en la parte inferior como se muestra a continuación:



La forma de las ROI puede ser circular con un diámetro mínimo de 200 micras y uno máximo de 600 micras. Las ROI también pueden realizarse de forma irregular.

Es muy recomendable que el cliente tenga en cuenta una "selección de ROI extra" por si la manipulación de las muestras durante el ensayo provocase la pérdida de tejido en el área donde había una selección de ROI. Esto es una recomendación para el caso en que alguno de los ROI inicialmente seleccionados no pudiese ser utilizado en el estudio en el momento de la confirmación de ROI.

Esta "selección de ROI extra" no debe ser enviada al laboratorio y debe conservarla el cliente para ser utilizada en el caso que sea necesario.

Por favor, revise el ANEXO I: "Presentación de cortes y ROI" y utilícelo como ejemplo de información que debe enviar al Laboratorio.

2.6. Segmentación de los ROI

Si el cliente desea realizar una segmentación de las ROI seleccionados, debe notificar al laboratorio el tipo de segmentación en base al marcador morfológico que se usará en el ensayo. Una ROI (Regions Of Interest) no segmentada dará lugar a un AOI (Areas Of Illumination). Una ROI segmentada dará lugar a tantas AOI como segmentos se hagan en la ROI.

Por ejemplo: en una ROI se quieren realizar dos segmentos: PanCK + y PanCK -. En este caso, 1 ROI = 2 AOIs. 1 AOI será PanCK + y 1 AOI PanCK -.

2.7. Tiempos estimados

De forma general, se suele agendar la realización del estudio a tres semanas vista **desde la aceptación del presupuesto del cliente**. Este tiempo puede variar dependiendo de la complejidad del ensayo, de la cantidad de muestras y de la cantidad de portaobjetos del proyecto.

2.8. Confirmación del laboratorio

Una vez se tenga toda la documentación mencionada en el punto 2.5 de este documento, el laboratorio se pondrá en contacto con el cliente para coordinar la recogida de los portaobjetos para el estudio.

2.9. Realización del ensayo

El ensayo de GeoMx consta de dos partes:

- Procesado de las muestras
- Lectura y carga de datos

El procesado de las muestras comprende desde la recepción de los portaobjetos hasta la recolección de los AOI y la puesta a punto para posterior lectura de oligos o marcadores moleculares únicos.

La lectura y carga de datos comprende la lectura de oligos en el equipo nCounter o secuenciador Illumina y la conversión de los datos un formato reconocible por el software (Data Analysis software) de análisis en el equipo GeoMx.

2.9.1. Procesado de las muestras

Nota: Todos los tiempos indicados en este punto son aproximados y dependen de la complejidad y de la cantidad de muestras y portaobjetos del estudio.

Generalmente el procesado de las muestras se realiza en 3-4 días. Siendo el primer día del protocolo los lunes o martes.

El segundo día de protocolo (que suele ser martes o miércoles) se realiza la selección de ROI por parte del Laboratorio utilizando la documentación remitida por el cliente (punto 2.5 de este documento). Y, **alrededor de las 13:30 hrs de este segundo día, se realiza una conexión vía Teams con el cliente para la confirmación de las ROI seleccionados previamente por el laboratorio.**

Esta conexión suele durar entre 30 y 40 minutos aproximadamente.

2.9.2. Lectura y carga de datos

Para este proceso no hace falta la intervención del cliente. El tiempo aproximado para la lectura y carga de datos puede durar 3-4 días dependiendo de la lectura en nCounter o del tiempo de secuenciación.

2.10. QC y acceso a los datos

Una vez finalizado el ensayo, el laboratorio realizará un control de calidad de los datos obtenidos y facilitará al cliente un nombre de usuario y una contraseña para el acceso al software de análisis en el GeoMx.

La conexión al software de análisis del GeoMx por parte del cliente se realiza a través de una conexión VPN. Contacte con su comercial de Diagnóstica Longwood para recibir asistencia adicional sobre la instalación, instrucciones y conexión VPN.

3. nCounter

Para realizar un diseño experimental adecuado y la consiguiente aceptación por parte del laboratorio para su ejecución, es necesario que el cliente conozca la siguiente información.

Este esquema representa de forma simplificada el proceso de los ensayos nCounter:



3.1. nCounter. consideraciones previas

Al laboratorio debe ser enviado el RNA cumpliendo los siguientes criterios de aceptación para el ensayo.

3.1.1 Requisitos de la muestra

EVALUACIÓN CUANTITATIVA:

Es necesario utilizar Qubit para la cuantificación.

Tipo de muestra	Volumen mínimo	Rangos de concentración	Concentración recomendada
RNA de tejido en parafina	15 µL	20 - 60 ng/µL	60 ng/µL
RNA de sangre, plasma, células, tejido, etc. (paneles CodeSets <400 genes)	15 µL	20 - 40 ng/µL	40 ng/µL
RNA de sangre, plasma, células, tejido, etc. (paneles CodeSet >400 genes)	15 µL	20 - 40 ng/µL	40 ng/µL

EVALUACIÓN CUALITATIVA:

Es necesario utilizar NanoDrop para conocer los ratios 260/280 y 260/230.

Los ratios recomendados para RNA son:

- 260/280: ~2.0
- 260/230: 2.0

También es necesario realizar una evaluación de la métrica de calidad DV200, que representa el porcentaje de fragmentos de RNA por encima de 200 nucleótidos y muestra una alta correlación con el rendimiento de la muestra.

Esta evaluación se puede realizar en el laboratorio CITOGEN si el cliente no dispone de Bioalalyzer.

NanoString recomienda que el DV200 sea al menos el 50% de la muestra.

Debido a la gran variedad de casos, un valor inferior al 50% de DV200 puede ser estudiado y evaluado para continuar con el estudio.

Contacte con el Especialista para evaluar su caso.

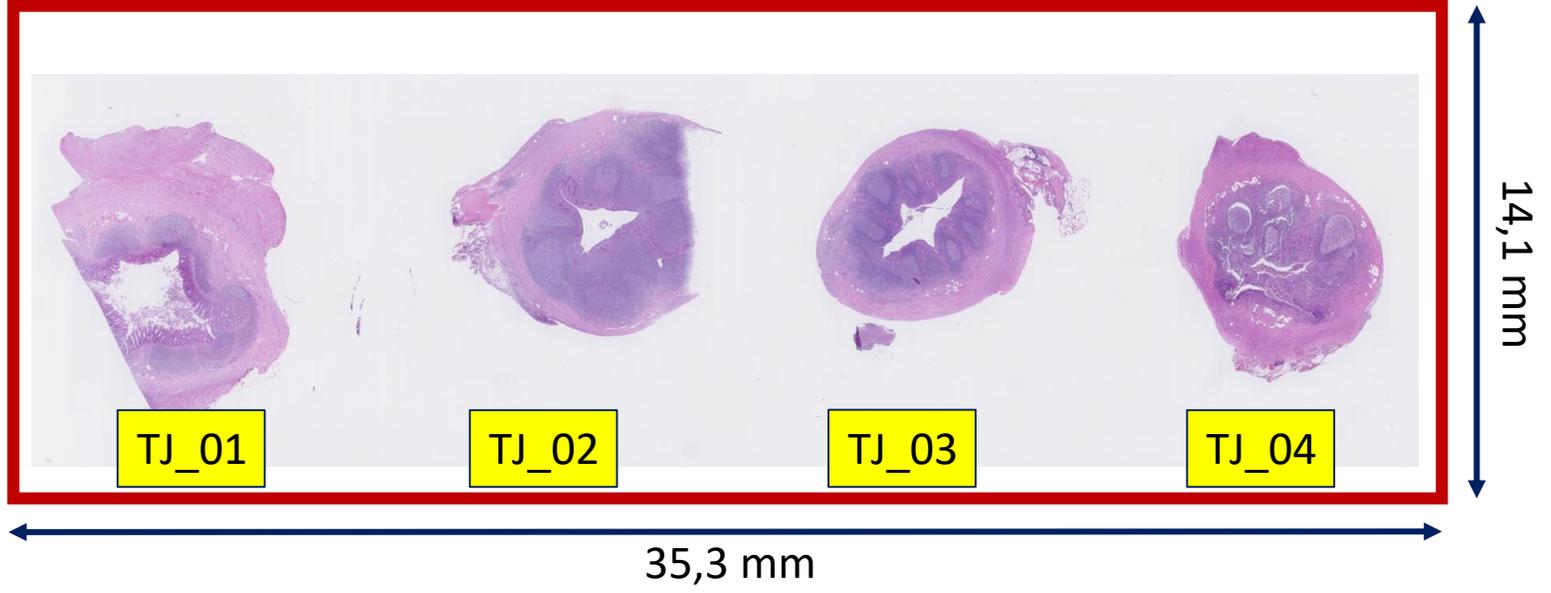
CITOGEN realiza controles de viabilidad a las muestras recibidas para confirmar que cumplen los requisitos para el ensayo. Si cualquiera de estos controles indica las muestras no son conformes para continuar el ensayo, se le avisará al cliente para confirmar los pasos a seguir.



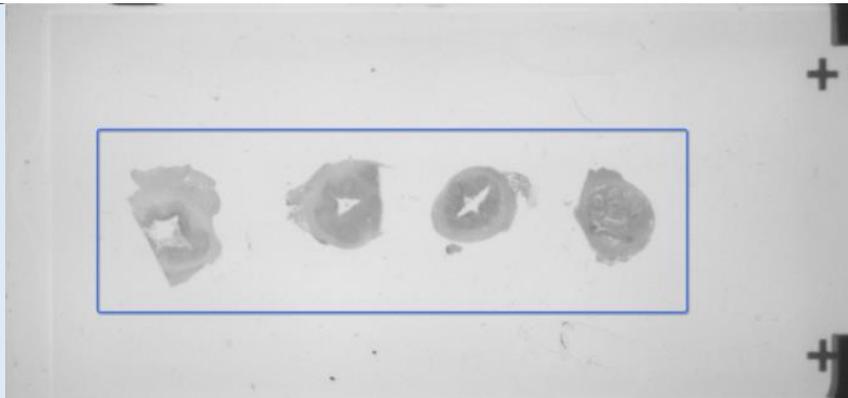
ANEXO I

Ejemplo de documentación:
“Presentación de cortes y ROI”

Slide 01



Slide 01



Yellow: mucosa

Red: B cells zone - follicle (CD20+)

Blue: T cell zone - follicle (CD3+)

Black: interfollicular zone (submucosa)

Green: muscular





Yellow: mucosa

Red: B cells zone - follicle (CD20+)

Blue: T cell zone - follicle (CD3+)

Black: interfollicular zone (submucosa)

Green: muscular



Yellow: mucosa

Red: B cells zone - follicle (CD20+)

Blue: T cell zone - follicle (CD3+)

Black: interfollicular zone (submucosa)

Green: muscular



Yellow: mucosa

Red: B cells zone - follicle (CD20+)

Blue: T cell zone - follicle (CD3+)

Black: interfollicular zone (submucosa)

Green: muscular