CITOGEN

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 2
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 3
2.6. Segmentación de las ROI 4
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
2.11. Pruebas de anticuerpos 6
3. nCounter 6
3.1. nCounter. Consideraciones previas 6
3.1.1 Requisitos de la muestra 7
4. Disposición de las muestras post-análisis 7

www. cagt.es · laboratorio@cagt.es · +34 976 556 484 · Camino del Pilón 86 C7, semisótano, 50011 Zaragoza

Cualquier duplicado de este documento sin autorización es una copia no controlada.

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.
Contacte con su comercial de Diagnóstica Longwood para recibir asistencia adicional sobre la instalación, instrucciones y conexión VPN.

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 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"**.
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.

www. cagt.es · laboratorio@cagt.es · +34 976 556 484 · Camino del Pilón 86 C7, semisótano, 50011 Zaragoza

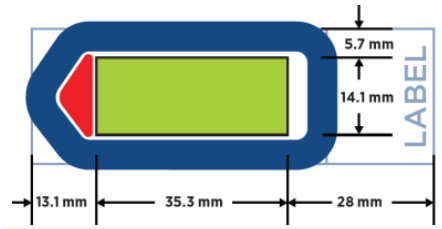
Cualquier duplicado de este documento sin autorización es una copia no controlada.

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:



MAN-10150 julio 2023

Si la distribución del tejido excede la zona recomendada (zona de escaneado), 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. **No es recomendable que la región de interés esté próxima a los bordes de la zona de escaneado.**

2.4. Cortes y envío de muestras al laboratorio

Los cortes deben ser de 5 µm de grosor y lo más recientes posibles para que haya un **máximo de 5 días** desde su corte al comienzo del ensayo. Después del montaje de las muestras en el portaobjetos, se recomienda un **secado de 20 min en estufa a 37°C. El envío se realizará el mismo día en el que se hagan los cortes.** Una vez realizados los cortes, se recomienda guardarlos a 4°C hasta el momento de su envío. En el caso de tejido fresh frozen, se guardará a -80°C y se enviará en hielo seco.

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, 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

www. cagt.es · laboratorio@cagt.es · +34 976 556 484 · Camino del Pilón 86 C7, semisótano, 50011 Zaragoza

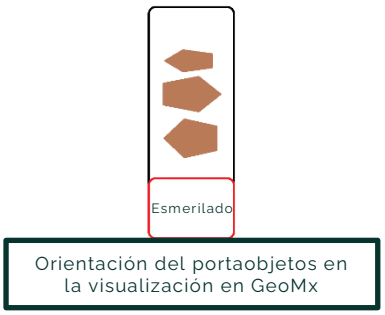
Cualquier duplicado de este documento sin autorización es una copia no controlada.

Para garantizar las necesidades en la selección de las Regiones de Interés (ROI), el laboratorio solicitará 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. Las imágenes serán enviadas al laboratorio una semana antes del envío de las muestras.

Estas imágenes deben tener la identificación del portaobjeto y la del tejido, así como tener señalizado 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 a su interés. 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 enviar una **"selección de ROI extra"** como precaución ante la posibilidad de pérdida de tejido debido a la manipulación en áreas previamente seleccionadas como ROI.

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 las ROI

Si desea realizar una segmentación de las ROI seleccionadas, debe notificar al laboratorio el tipo de segmentación en base al marcador morfológico que se usará en el ensayo. Una ROI (Region Of Interest) no segmentada dará lugar a un AOI (Area 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 -.

www. cagt.es · laboratorio@cagt.es · +34 976 556 484 · Camino del Pilón 86 C7, semisótano, 50011 Zaragoza

Cualquier duplicado de este documento sin autorización es una copia no controlada.

Es muy importante tener en cuenta que en cada ensayo de GeoMX el sistema utiliza el primer pocillo de la placa como control negativo. Por consiguiente, para 96 AOIs (Áreas de Interés Únicas), se asignarán dos controles negativos y dos placas de recolección.

2.7. Tiempos estimados

De forma general, se suele agendar la realización del estudio a **tres semanas** vista **desde la aceptación del presupuesto**. 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 gestionará 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 las 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 a un formato reconocible por el 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.

El **tercer** día de protocolo se realiza la selección de ROI por parte del Laboratorio, utilizando la información remitida (punto 2.5 de este documento). Ese día, se realiza una **conexión** (30-40 minutos, aproximadamente) mediante la plataforma **Microsoft Teams** a fin de **confirmar las ROI** seleccionados previamente por el Laboratorio.

En el ensayo de GeoMX, las muestras pasan por procesos fisicoquímicos que por razones multifactoriales podrían deteriorar la integridad del tejido, pudiendo afectar a las zonas de interés para el estudio. Para disminuir el riesgo de sufrir este deterioro, es recomendable tener en cuenta lo siguiente:

- Utilizar los portaobjetos recomendados.
- Utilizar bloques menores a 3 años de antigüedad a la fecha del estudio. (*)
- Realizar un secado de 20 min en estufa a 37ºC.

www. cagt.es · laboratorio@cagt.es · +34 976 556 484 · Camino del Pilón 86 C7, semisótano, 50011 Zaragoza

Cualquier duplicado de este documento sin autorización es una copia no controlada.

- Evitar utilizar biopsias de aguja.
- Evitar solapamiento de tejido.

(*) *GeoMx ha sido validado para bloques de muestras de hasta 3 años de antigüedad preparados a partir de tejidos con un tiempo de isquemia fría de menos de 1 hora utilizando NBF al 10% o un fijador similar. Para obtener mejores resultados, no utilice bloques FFPE de más de 10 años de antigüedad.*

Independientemente de lo anterior, cumplir con los requisitos de muestra recomendados no garantiza que en el proceso no pueda perderse parte de tejido de interés.

2.9.2. Lectura y carga de datos

El tiempo aproximado para la lectura y carga de datos puede durar una semana, 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 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 desde el exterior del laboratorio 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.**

2.11. Pruebas de anticuerpos

Si se requiere la utilización de marcadores morfológicos que no han sido testados previamente por nanoString, se realizará una validación de estos anticuerpos en el tejido de interés. Contacte con nuestro Departamento de Contratación (contratacion_cagt@cagt.es) para recibir presupuesto.

3. nCounter

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

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

3.1. nCounter. Consideraciones previas

www. cagt.es · laboratorio@cagt.es · +34 976 556 484 · Camino del Pilón 86 C7, semisótano, 50011 Zaragoza

Cualquier duplicado de este documento sin autorización es una copia no controlada.

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

Para extracciones de tejido en parafina, 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. **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 que las muestras no son conformes para continuar el ensayo, se le avisará para confirmar los pasos a seguir.

4. Disposición de las muestras post-análisis

Una vez que se haya completado el análisis, es necesario que nos comunique qué desea hacer con las muestras:

- Destrucción de las muestras
- Devolución de las muestras: Si prefiere que le enviemos de vuelta las muestras después del análisis, nos pondremos en contacto con usted para coordinar los detalles del envío.
- Envío a otra dirección. En caso de que desee que enviemos las muestras a una dirección diferente a la que nos ha proporcionado anteriormente, por favor, indique la siguiente información:
  [Nombre completo del destinatario]
  [Dirección de correo electrónico del destinatario]
  [Dirección postal completa del destinatario]

Si tiene alguna pregunta o necesita más información, no dude en ponerse en contacto con nosotros a través del correo electrónico **laboratorio@cagt.es**

www. cagt.es · laboratorio@cagt.es · +34 976 556 484 · Camino del Pilón 86 C7, semisótano, 50011 Zaragoza

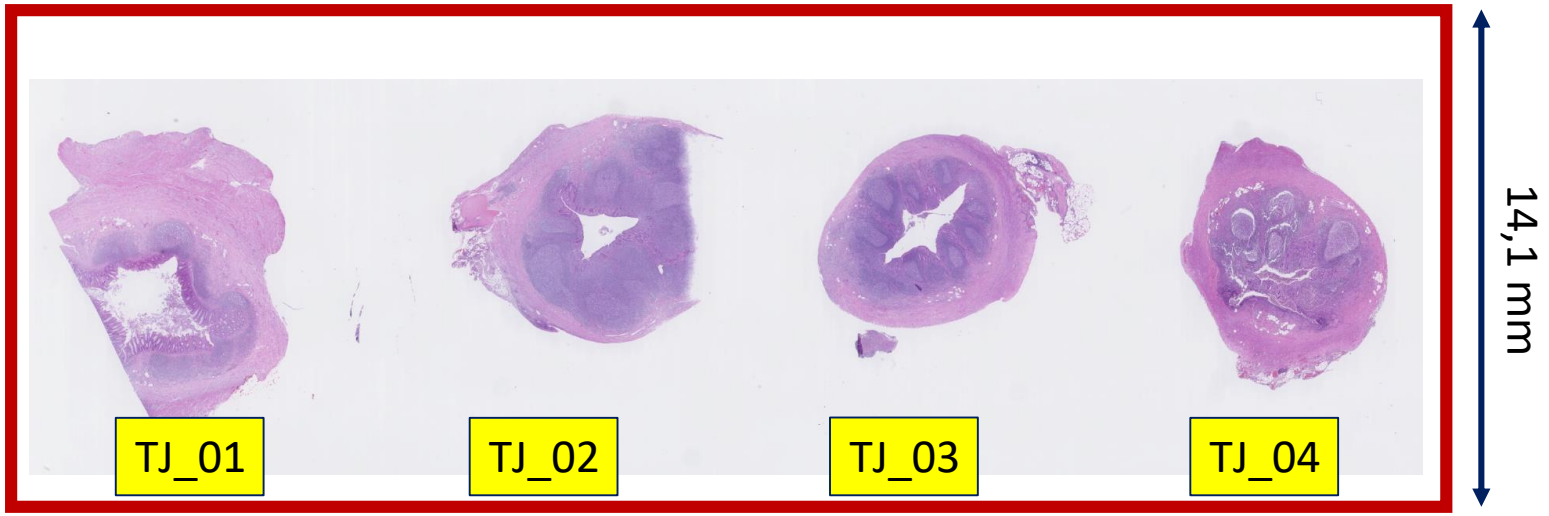
Cualquier duplicado de este documento sin autorización es una copia no controlada.

CITOGEN

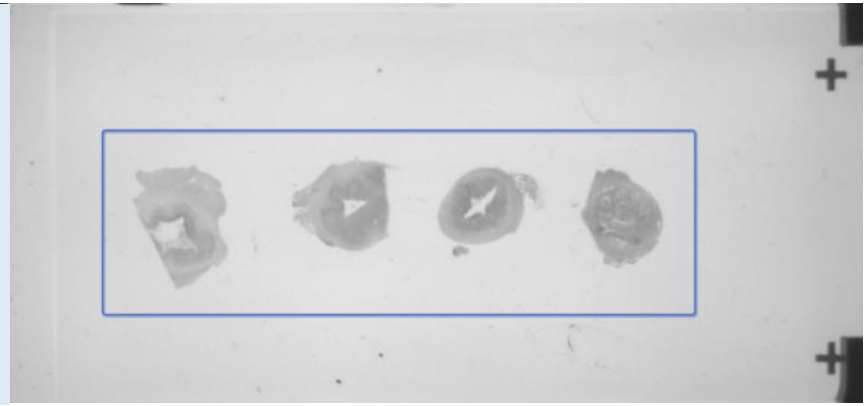
ANEXO I

Ejemplo de documentación:
“Presentación de cortes y ROI”

Slide 01



Slide 01



Slide 01, TJ_01

Yellow: mucosa
Red: B cells zone - follicle (CD20+)
Blue: T cell zone - follicle (CD3+)
Black: interfollicular zone (submucosa)
Green: muscular

Slide 01, TJ_02

Yellow: mucosa
Red: B cells zone - follicle (CD20+)
Blue: T cell zone - follicle (CD3+)
Black: interfollicular zone (submucosa)
Green: muscular

Slide 01, TJ_03

Yellow: mucosa
Red: B cells zone - follicle (CD20+)
Blue: T cell zone - follicle (CD3+)
Black: interfollicular zone (submucosa)
Green: muscular

Slide 01, TJ_04

Yellow: mucosa
Red: B cells zone - follicle (CD20+)
Blue: T cell zone - follicle (CD3+)
Black: interfollicular zone (submucosa)
Green: muscular