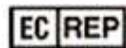


Sólo para uso profesional

Kit de genotipado PCR en tiempo real de *mutaciones BRCA*

MANUAL DE USO



OBELIS S.A
Dirección registrada:
Bd. Général Wahis, 53
1030 Bruselas, Bélgica
Tel: +32.2.732.59.54
Fax: +32.2.732.60.03
Correo electrónico:
mail@obelis.net
<http://www.obelis.net>



"DNA-Technology Research & Production", LLC
Rusia, 142281, Región de Moscú,
Protvino, calle
Zheleznodorozhnaya 20,
Teléfono/fax:
+7(495) 640.17.71
+7(4967)31.06.70,
Correo electrónico: protvino@dna-technology.ru, mail@dna-technology.ru
<http://www.dna-technology.ru>
Servicio de atención al cliente:
+7(800)200.75.15
Correo electrónico: hotline@dna-technology.ru,
www.dna-technology.ru

TABLA DE CONTENIDOS

1. USO PREVISTO	4
2. MÉTODO	4
3. CONTENIDO	6
4. REACTIVOS Y EQUIPOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS	7
5. CONDICIONES DE TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO	8
6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	9
7. MUESTRAS	10
8. PROCEDIMIENTO	11
9. CONTROLES	13
10. ANÁLISIS DE DATOS	14
11. ESPECIFICACIONES	16
12. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS	17
13. CONTROL DE CALIDAD	17
14. GUIA DE SÍMBOLOS	19

1. USO PREVISTO

El Kit de **Genotipado PCR REAL-TIME de mutaciones BRCA** está destinado a aplicaciones de investigación y diagnóstico. El Kit de **Genotipado PCR REAL-TIME de las mutaciones BRCA** es un producto *in vitro* basado en la prueba de ácido nucleico (NAT) - genotipado humano. El Kit de **genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA** está diseñado para detectar y discriminar ocho polimorfismos genéticos asociados al cáncer de mama y de ovario (OMIM #604370; #612555): BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA) y BRCA2 (6174delT). El **kit de genotipado de mutaciones BRCA por PCR en tiempo real** se basa en el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los resultados pueden utilizarse para el diagnóstico de formas hereditarias de cáncer de mama y de ovario y para la predicción de las correspondientes formas hereditarias de cáncer en familiares de primera línea.

No hay contraindicaciones para el uso del **Kit de genotipado de mutaciones BRCA por PCR en tiempo real**. El trasplante de médula ósea puede afectar teóricamente a los resultados. En este caso, serán necesarios estudios adicionales.

El **kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA** puede utilizarse en los laboratorios clínicos y de diagnóstico de las instituciones médicas y en la práctica de la investigación.

La aplicación del kit no depende de los aspectos poblacionales y demográficos (las características de diagnóstico del kit se determinan sólo para las mujeres de la Federación Rusa).

Usuarios potenciales: personal cualificado en métodos de diagnóstico molecular y que trabaja en clínicas y laboratorios clínicos.

Es necesario aplicar el kit sólo como se indica en este manual de usuario.

2. MÉTODO

El método de PCR implementado se basa en la amplificación de una secuencia de ADN objetivo.

La detección se basa en el análisis de la curva de fusión (melting curve analysis).

El **kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA** emplea sondas fluorescentes, cada una de ellas específica para uno de los dos alelos de un gen. La mezcla de PCR contiene dos sondas específicas para cada alelo, marcadas de forma distinguible con fluoróforos reporteros (Fam y Hex) para cada variante de polimorfismo. Después de la amplificación, se realiza la fusión de los complejos amplicón-sonda de señalización. El resultado es un cambio en el nivel de fluorescencia que es detectado por el termociclador en tiempo real y es representado por el software como un gráfico. Si la sonda de señal es parcialmente complementaria al ADN-objetivo, la temperatura de fusión será menor que en el caso de que la sonda de señal sea absolutamente complementaria al ADN-objetivo. La interpretación de los resultados se realiza en base a las temperaturas de fusión.

En la mezcla de PCR para cada polimorfismo se incluye el sistema de amplificación del ADN genómico humano. El control cuantitativo de ADN humano en el tubo de amplificación que excluye errores en el genotipado.

El sistema para la amplificación del ADN genómico humano incluye una sonda de ADN con una etiqueta fluorescente (Cy5) y una molécula quencher. Mientras se hibridan con una secuencia objetivo, las sondas fluorescentes se inactivan (se apagan). Cuando se sintetiza el amplicón, las sondas se desnaturalizan y la etiqueta fluorescente deja de estar apagada y, por tanto, proporciona una señal fluorescente. La intensidad de la fluorescencia se mide con el termociclador de PCR en tiempo real en cada paso y se analiza con el software suministrado. La aplicación de tres fluoróforos permite

determinar dos alelos y estimar la cantidad de ADN genómico simultáneamente en un tubo. La tabla 1 muestra los canales de detección de la mezcla PCR.

Tabla 1. Canales de detección de los productos de amplificación

PCR-mix	Canales de detección				
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
BRCA1: 185delAG	N	m	-	IC	-
BRCA1: 4153delA	N	m	-	IC	-
BRCA1: 5382insC	N	m	-	IC	-
BRCA1: 3819delGTAAA	N	m	-	IC	-
BRCA1: 3875delGTCT	N	m	-	IC	-
BRCA1:300T>G (Cys61Gly)	N	m	-	IC	-
BRCA1: 2080delA	N	m	-	IC	-
BRCA2: 6174delT	N	m	-	IC	-

Donde N- alelo normal, m-alelo mutante, IC - Sistema de control interno (sistema de amplificación de ADN humano, que permite estimar la cantidad de ADN en el tubo de amplificación y eliminar los errores de genotipado).

El análisis automático disponible en los instrumentos fabricados por "DNA-Technology": Termocicladores DTlite o DTprime REAL-TIME (consulte el catálogo en www.dna-technology.ru/en para ver las opciones de suministro disponibles).

La versión actual del software está disponible para su descarga en <http://www.dna-technology.ru/eng/support/>.

3. CONTENIDO

El **kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA** contiene una mezcla PCR, un búfer PCR, una polimerasa TechnoTaq MAX y aceite mineral. La descripción detallada del contenido está representada en la Tabla 2.

Tabla 2. Contenido del **kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA**, para R1-H927-N3/4EU

Reactivo	Descripción	Volumen total	Cantidad
Mezcla de PCR:			
BRCA1: 185delAG	Líquido incoloro y transparente	960 µL	1 tubo
BRCA1: 4153delA		960 µL	1 tubo
BRCA1: 5382insC		960 µL	1 tubo
BRCA1: 3819delGTAAA		960 µL	1 tubo
BRCA1: 3875delGTCT		960 µL	1 tubo
BRCA1: 300 T>G (Cys61Gly)		960 µL	1 tubo
BRCA1: 2080delA		960 µL	1 tubo
BRCA2: 6174delT		960 µL	1 tubo
Buffer PCR	Líquido transparente incoloro	4 mL (1 mL por tubo)	4 tubos
Polimerasa TechnoTaq MAX	Líquido transparente incoloro	200 µL	1 tubo
Aceite mineral	Líquido aceitoso viscoso e incoloro	8 ml	1 vial
Controles positivos:	Líquido transparente incoloro		
"C+1" (alelo homocigoto)		270 µL	1 tubo
"C+2" (heterocigoto)		270 µL	1 tubo

El **Kit de genotipado PCR en tiempo real de mutaciones BRCA** contiene muestras de control positivo: C+1 [alelo homocigoto] y C+2 [heterocigoto]. Los controles positivos son mezclas de partes clonadas de los genes diana BRCA1 y BRCA2 detectables con ayuda del kit. Las muestras de control están destinadas a controlar la calidad de la prueba por parte del usuario.

El **Kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA** está diseñado para 48 pruebas, incluyendo el análisis de muestras desconocidas y muestras de control negativo.

4. REACTIVOS Y EQUIPOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

4.1. Recogida de muestras

Se requiere un equipo de toma de muestras de sangre. Por favor, utilice sólo EDTA como anticoagulante, ya que otras sustancias pueden proporcionar la inhibición de la PCR.

4.2 Extracción de ADN y PCR

Zona de preparación de muestras y controles previa a la toma de muestras:

- Cabina de seguridad biológica clase II;
- Cabina de PCR UV;
- Mezclador vórtex;
- Nevera;
- Kit de extracción de ácido nucleico ("DNA-Technology" hecho PREP-GS Genetics **REF**P-023/4EU o PREP- RAPID **REF**GeneticsP-021/4EU son recomendados);
- Centrífuga de alta velocidad (RCF 13000 x g);
- Baño seco Termostatado (rango de temperatura 50-98°C);
- Gradilla para tubos de PCR de 1,5 mL;
- Tubos de 1,5 mL;
- Solución salina fisiológica al 0,9% de NaCl (estéril);
- Contenedor para las puntas de pipeta usadas;
- Pipetas monocal (rango de volumen 20-200 µl, 200-1000 µl);
- Puntas con filtro libres de RNasa y DNasa (rango de volumen 200 µl, 1000 µl);
- Guantes quirúrgicos sin polvo;
- Solución desinfectante.

Zona de preamplificación y preparación de reactivos:

- Mezclador vórtex;
- Nevera;
- Gradilla para tubos de PCR de 0,2 mL;
- Pipetas monocal (rango de volumen 20-200 µL, 200-1000 µL);
- Puntas con filtro libres de RNasa y DNasa (rango de volumen 20 µL, 50 µL, 200 µL, 1000 µL);
- Guantes quirúrgicos sin polvo;
- Tubos de 0,2 mL;
- Solución desinfectante;
- Contenedor para las puntas de pipeta usadas.

Post-Amplificación - Área de detección de la amplificación:

- Termociclador de PCR en tiempo real.

Software:

La versión más reciente del software de los termocicladores de PCR en tiempo real DTprime y DTlite puede descargarse de <http://www.dna-technology.ru/eng/support/>.

Sistema operativo compatible: todas las versiones de Windows a partir de la 7.

5. CONDICIONES DE TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO

Fecha de caducidad: 12 meses a partir de la fecha de producción

Todos los componentes del **Kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA**, excepto la polimerasa TechnoTaq MAX, deben almacenarse a temperaturas de 2°C a 8°C. El PCR-mix debe almacenarse a temperaturas de 2°C a 8°C protegida de la luz. La temperatura y la luz excesivas pueden ser perjudiciales para el rendimiento del producto. La polimerasa TechnoTaq MAX debe almacenarse a temperaturas de -18°C a -22°C .

El kit puede ser transportado a temperaturas de 2 °C a 8 °C. Se permite transportar la TechnoTaq MAX polimerasa a temperaturas de 2 °C a 8 °C durante no más de 5 días.

Duración del kit una vez abierto:

- Los componentes del kit deben almacenarse a temperaturas de entre 2 °C y 8 °C durante el almacenamiento;
- La mezcla de PCR para la amplificación debe almacenarse a temperaturas de entre 2 °C y 8 °C protegido de la luz;
- La polimerasa TechnoTaq MAX debe almacenarse a temperaturas entre -18 °C y -22 °C durante el almacenamiento.

No se debe utilizar el **Kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA** después de la fecha de expiración .

Se recomienda seguir las instrucciones dadas para obtener resultados precisos y fiables.

La conformidad del **Kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA** con los requisitos técnicos prescritos está sujeta al cumplimiento de las condiciones de almacenamiento, transporte y manipulación recomendadas por el fabricante.

Póngase en contacto con nuestro representante oficial en la UE por problemas de calidad del **Kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA**.

6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Manipule y elimine todas las muestras biológicas, reactivos y materiales utilizados para realizar el ensayo como si pudieran transmitir agentes infecciosos. Las muestras deben emplearse exclusivamente para un determinado tipo de análisis. Las muestras deben manipularse bajo una cabina de flujo laminar. Los tubos que contengan diferentes muestras no deben abrirse nunca al mismo tiempo. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben ser empleadas exclusivamente para este fin específico. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o utilizarse con puntas de filtro. Las puntas empleadas deben ser estériles, libres de DNAsas y RNAsas, libres de ADN y ARN. Los reactivos deben manipularse en una cabina de flujo laminar. Los reactivos necesarios para la amplificación deben prepararse de forma que puedan utilizarse en una sola sesión. Las pipetas utilizadas para la manipulación de los reactivos deben emplearse exclusivamente para este fin específico. Evitar el contacto directo con los reactivos de las muestras biológicas y los materiales utilizados para realizar el ensayo. Utilizar guantes quirúrgicos sin polvo. Evitar producir derrames o aerosoles. Todo el material que se exponga a las muestras biológicas debe ser tratado durante al menos 30 minutos con una solución desinfectante o ser autoclavado durante 1 hora a 121°C antes de su eliminación.

Los procedimientos de biología molecular, como la extracción de ácidos nucleicos, la transcripción inversa, la amplificación y la detección, requieren personal cualificado para evitar el riesgo de resultados erróneos, especialmente debido a la degradación de los ácidos nucleicos contenidos en las muestras o a la contaminación de las mismas por los productos de amplificación.

Todos los componentes de oligonucleótidos son producidos por tecnología de síntesis artificial según el protocolo de control de calidad interno y no contienen sangre ni productos del procesamiento de la sangre.

El control positivo se produce mediante la tecnología de síntesis artificial de ADN. El control positivo no incluye partes de agentes infecciosos.

Todas las soluciones líquidas están diseñadas para un solo uso y no pueden utilizarse más de una vez en reacciones de amplificación. Los tubos de plástico no contienen ftalatos. No inhalar los gases/humos/vapores/spray producidos por los componentes del kit. No comer/beber los componentes del kit. Evitar el contacto con los ojos. Utilizar únicamente los reactivos suministrados en el kit y los recomendados por el fabricante. No mezclar reactivos de diferentes lotes. No utilice reactivos de kits de otros fabricantes. Todo el material de laboratorio, incluidas las pipetas, las gradillas para tubos de ensayo, el material de vidrio de laboratorio, las batas de laboratorio, etc., así como los reactivos, deben estar estrictamente inmóviles. No está permitido trasladarlos de una sala a otra. Equipe zonas separadas para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación. No introducir nunca un producto de amplificación en la zona destinada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación. Usar batas, guantes y herramientas de laboratorio, que se emplean exclusivamente para la extracción/preparación de la reacción de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación. No trasladar nunca las batas, guantes y herramientas de laboratorio de la zona destinada a la amplificación/detección de los productos de amplificación a la zona destinada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación. Los productos de amplificación deben manipularse de forma que se reduzca al máximo la dispersión en el entorno, para evitar la posibilidad de contaminación. Las pipetas utilizadas para manipular los productos de amplificación deben emplearse exclusivamente para este fin específico. Retire los residuos de la PCR únicamente de forma cerrada. No abra los tubos después de la amplificación. Los materiales de desecho se eliminan de acuerdo con las normas locales y nacionales. Todas las superficies del laboratorio (mesas de trabajo, estantes para tubos de ensayo, equipos, etc.) deben tratarse diariamente con una solución desinfectante.

Acciones de emergencia

Inhalación: La inhalación de la mezcla maestra contenida en este kit es poco probable, sin embargo, se debe tener cuidado.

Contacto con los ojos: Si algún componente de este kit entra en contacto con los ojos, lávelos suavemente con agua corriente potable durante 15 minutos o más, asegurándose de mantener los párpados abiertos. Si se

produce dolor o irritación, obtenga atención médica.

Contacto con la piel: Si algún componente de este kit entra en contacto con la piel y causa molestias, quítese la ropa contaminada. Lavar la zona afectada con abundante agua y jabón. Si se produce dolor o irritación, obtenga atención médica.

Ingestión: Si se ingiere cualquier componente de este kit, lavar la boca con agua. Si se produce irritación o malestar, obtenga atención médica.

No utilice el kit:

- Cuando se incumplen las condiciones de transporte y almacenamiento;
- Cuando el aspecto de los reactivos no responde al pasaporte del kit;
- Cuando el embalaje de los componentes del kit se rompe;
- Después de la fecha de caducidad prevista.

NO se han visto efectos adversos para la salud por el uso rutinario de este kit si se siguen las instrucciones indicadas en el presente manual.

7. MUESTRAS

El **Kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA** está diseñado para detectar el ADN extraído de la sangre periférica.

El muestreo, los procedimientos de procesamiento de la muestra y el almacenamiento se llevan a cabo de acuerdo con las instrucciones del kit de extracción de ADN de material biológico.

La toma de muestras de sangre periférica se realiza en un tubo de plástico al vacío. Pueden ser tubos de extracción de sangre Vacuette de 2,0 o 4,0 mL con anticoagulante, por ejemplo sal de etilendiaminotetraacetato (EDTA) a una concentración final de 2,0 mg/mL. Después de tomar el material, es necesario mezclar la sangre con el anticoagulante invirtiendo el tubo 2 - 3 veces.



No está permitido utilizar la heparina como anticoagulante.

Las muestras pueden almacenarse a temperaturas de entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de 24 horas. Cuando sea imposible entregar el material en el laboratorio durante el día, se permite una única congelación del material. El material congelado se puede almacenar a temperaturas de -18 °C a -22 °C durante 6 meses.



La descripción detallada de los procedimientos de muestreo y procesamiento de muestras, así como los requisitos de almacenamiento y transporte de muestras citados en los manuales de usuario de los kits de extracción PREP-GS Genetics y PREP-RAPID Genetics.

8. PROCEDIMIENTO

La extracción de ADN se realiza de acuerdo con las instrucciones del kit de extracción. Se recomiendan los kits de extracción PREP-GS GENETICS y PREP-RAPID GENETICS. El kit de extracción PREP-GS GENETICS está pensado para el almacenamiento a largo plazo del ADN extraído (hasta 6 meses). El ADN extraído con ayuda del Kit de Extracción PREP-RAPID GENETICS no debe almacenarse más de un mes. El ADN extraído puede utilizarse para unas 50 reacciones para determinar polimorfismos genéticos.



Independientemente del kit de extracción de ADN utilizado, una muestra de control negativo debe pasar por todas las etapas de la extracción de ADN. La solución salina fisiológica puede utilizarse como muestra de control negativo en los volúmenes indicados.



La cantidad de ADN a analizar debe ser mayor o igual a 1,0 ng por reacción (el parámetro Cp para IC no debe ser superior a 32). La violación de este requisito afectará a la validez del análisis y anulará la garantía del fabricante.



Procedimiento de ensayo

Los reactivos y los tubos deben mantenerse alejados de la luz solar directa.

8.1 Marque el número necesario de tubos de PCR de 0,2 mL para cada uno de los polimorfismos a analizar (un tubo para cada muestra a analizar y tres extra - uno para el control negativo "C-" y dos para los controles positivos "C+").

Ejemplo: para analizar 5 muestras en una misma ronda de PCR, marque 40 tubos para las muestras, 8 tubos para "C-" y 16 tubos para "C+". El número de tubos resultante es de 64. Véase la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Marcado del tubo

Muestra	Mezcla de PCR / tubo №							
	BRCA1							BRCA2
	185 delAG	4153 delA	5382 insC	3819 delGTAAA	3875 delGTCT	300 T>G	2080 delA	6174 delT
1	1	2	3	4	5	6	7	8
2	9	10	11	12	13	14	15	16
3	17	18	19	20	21	22	23	24
4	25	26	27	28	29	30	31	32
5	33	34	35	36	37	38	39	40
C-	41	42	43	44	45	46	47	48
C+1	49	50	51	52	53	54	55	56
C+2	57	58	59	60	61	62	63	64

8.2 Agite los tubos con las mezclas de PCR durante 3-5 segundos y a continuación centrifugar durante 1-3 segundos para recoger las gotas.

8.3 Añada 20 µL de la mezcla de PCR correspondiente en los tubos marcados (utilice una punta de pipeta nueva para cada tipo de mezcla de PCR).

8.4 Agite los tubos con el búfer de PCR y la polimerasa TechnoTaq MAX durante 3-5 segundos, y luego centrifugar durante 1-3 segundos para recoger las gotas.



La polimerasa TechnoTaq MAX debe almacenarse a temperaturas de -18°C a -22°C. La exposición a la temperatura ambiente sólo se permite durante un corto período de tiempo. Sacar del congelador justo antes de su uso y colocar en hielo.

8.5 Preparar la mezcla de búfer PCR y TechnoTaq MAX polimerasa. Añadir en un tubo:

- 10×(N+1) µL de búfer PCR,
- 0,5×(N+1) µL de TechnoTaq MAX polimerasa,

N - número de los tubos marcados, incluyendo "C-" y "C+".

Ejemplo: para el análisis simultáneo de 5 muestras, "C-" y dos "C+" en una sola ronda de PCR. Mezcle 650 µL de búfer de PCR y 32,5 µL de TechnoTaq MAX polimerasa (calcular el volumen final para 65 (64+1) tubos).



La mezcla del búfer de PCR y la polimerasa TechnoTaq MAX debe prepararse justo antes de su uso.

8.6 Realice vortex el tubo durante 3-5 segundos, luego centrifugar durante 1-3 segundos para recoger las gotas.

8.7 Añada 10 µL de búfer de PCR y la mezcla de polimerasa TechnoTaq MAX en cada tubo de PCR.



Siga los pasos indicados en los puntos 8.8 - 8.14 dentro de las dos horas siguientes a la adición del búfer de PCR y de la mezcla de polimerasa TechnoTaq MAX a la mezcla de amplificación.

8.8 Añadir una gota (20 µL) de aceite mineral en cada tubo de PCR. Cierre los tubos.



Abra el tapón del tubo, añada la muestra de ADN (o la muestra de control) y, a continuación, cierre el tubo antes de pasar al siguiente para evitar la contaminación. Utilice puntas de filtro.

8.9 Agitar los tubos con las muestras, "C-" y "C+" durante 3-5 segundos y centrifugar durante 1- 3 segundos.

8.10 Añada 5,0 µL de muestra de ADN en los tubos de PCR correspondientes. No añada ADN en los tubos "C-", "C+". Cierre bien los tubos.

8.11 Añada 5,0 µL de control negativo (C-) que haya pasado todo el procedimiento de extracción de ADN y los controles positivos (C+1, C+2) en los tubos correspondientes. Cerrar bien los tubos.

8.12 Centrifugar los tubos brevemente durante 1-3 segundos.

8.13 Coloque los tubos en el termociclador DTLite o DTprime.

8.14 Inicie la aplicación RealTime_PCR en modo "Device operation". Cargue el archivo .ini suministrado con el kit antes de la primera ejecución. Consulte el manual de usuario del termociclador DTLite o DTprime para conocer los detalles del trabajo con los archivos .ini. Añada la prueba correspondiente o utilice el modo de prueba múltiple en lo sucesivo. Especifique el número y los tipos de muestras, incluidos los controles negativos y positivos.



Definir la posición de los tubos en la interfaz del software de acuerdo con la posición que se fijó en el bloque térmico (ver. p. 8.13).

Ejecuta la PCR.



El tipo de tubos de control positivo y negativo debe especificarse como "Muestra".

Al seleccionar una prueba, la Tabla 4 debería aparecer en la ventana "Iniciar ejecución".

Tabla 4. El programa de PCR para los termocicladores DTLite y DTprime

Paso	La temperatura, °C	Incremento de temperatura, °C	Min.	Sec.	Número de ciclos	Medición óptica	Tipo de paso
1	80	-	2	00	1		Ciclo
	94	-	5	00			
2	94	-	0	30	5		Ciclo
	64	-	0	15		v	
	67	-	0	5			
3	94	-	0	5	45		Ciclo
	64	-	0	15		v	
4	25	-	0	30	1		Ciclo
5	25	1	0	15	50	v	Melting, $\Delta t=1^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{fin}}=75^{\circ}\text{C}$
6	10		Holding		Holding

9. CONTROLES

El **kit de genotipado por PCR en tiempo real de mutaciones BRCA** contiene muestras de control positivo: C+1 [alelo homocigoto] y C+2 [heterocigoto]. El control positivo es una parte clonada del genoma. Se produce con técnicas de ingeniería genética y se caracteriza por la secuenciación automática del ADN. La mezcla de PCR del kit incluye el control interno (IC). El CI es un plásmido artificial destinado a evaluar la calidad del rendimiento de la PCR. Para revelar una posible contaminación se requiere un control negativo.



Una muestra de control negativo debe pasar por todas las etapas de la extracción de ADN. La solución salina fisiológica puede utilizarse como muestra de control negativo en los volúmenes indicados en las instrucciones suministradas.

Los resultados de "C+1" deben ser homocigotos del alelo.

Los resultados de "C+2" deben ser heterocigotos.

El resultado de la prueba se considera válido cuando se define el genotipo.

El resultado de la prueba se considera inválido cuando el Cp de IC (Cy5) es inferior a 32 o está ausente.

Si la señal de "C-" está presente, todas las pruebas del lote actual se consideran falsas. Se requiere una descontaminación.

10. ANÁLISIS DE DATOS

El registro y la interpretación de los resultados de la PCR se realizan en modo automático. El gráfico mostrará la dependencia de la fluorescencia de la temperatura de fusión para cada tubo del termobloque. La tabla mostrará el ID de la muestra, el nombre del polimorfismo detectado y el resultado del genotipado de cada muestra. Es posible crear e imprimir un informe basado en los resultados del análisis. Por favor, consulte el manual de usuario del termociclador DTLite o DTprime para conocer los detalles del trabajo con el software.

El software registra el resultado de la amplificación del ADN genómico humano (IC) para todas las muestras. Para las muestras que contienen una cantidad suficiente de ADN para un análisis correcto, el software define el genotipo, que se muestra en la tabla en la columna "Polimorfismo". Las muestras que contengan una cantidad insuficiente de ADN (menos de 1,0 ng por reacción o Cp>32) se analizarán como "no válidas" (resultado incierto).

Results				
Statistics				
Melting Curve				
IC				
Nº	Identificador	Test	Polimorphism	
A1	Sample_1	BRCA1:185delAG	N	N
B1	Sample_1	BRCA1:4153delA	N	N
C1	Sample_1	BRCA1:5382insC	N	N
D1	Sample_1	BRCA1:3819delGTAAA	N	N
E1	Sample_1	BRCA1:3875delGTCT	N	N
F1	Sample_1	BRCA1:300 T>G (Cys61G	N	N
G1	Sample_1	BRCA1:2080delA	N	N
H1	Sample_1	BRCA2:6174delT	N	N
A2	Sample_2	BRCA1:185delAG	N	N
B2	Sample_2	BRCA1:4153delA	N	m
C2	Sample_2	BRCA1:5382insC	N	N
D2	Sample_2	BRCA1:3819delGTAAA	N	N
E2	Sample_2	BRCA1:3875delGTCT	N	N
F2	Sample_2	BRCA1:300 T>G (Cys61G	N	N
G2	Sample_2	BRCA1:2080delA	N	N
H2	Sample_2	BRCA2:6174delT	N	N



Debido a la gran importancia médica y social del estado de portador de la mutación BRCA1 o BRCA2, se recomienda volver a analizar las muestras heterocigotas, a partir del paso de extracción del ADN.

El software define el genotipo correspondiente en las muestras de control positivo:

C+1 [alelo homocigoto] -

N	N
---	---

C+2 [heterocigoto] -

N	m
---	---

Para las muestras con una cantidad insuficiente de ADN para el análisis (menos de 1,0 ng por reacción o $C_p > 32,0$ en el canal de detección IC), el software define el resultado incierto: invalid invalid

En caso de que el resultado sea incierto, es necesario repetir el método de PCR con la misma muestra de ADN, o la extracción de ADN y la PCR, o la toma de sangre (realizada de forma secuencial).

Para las muestras de control negativo, el software define un resultado incierto: invalid invalid

En caso de resultado positivo en un control negativo, los resultados de todas las pruebas del lote actual se consideran inciertos. Es necesario llevar a cabo medidas especiales para eliminar la contaminación.



Los ensayos de genotipado con tecnología de ADN proporcionan información genética para algunos, pero no todos los loci polimórficos que se sabe que están asociados a ciertas condiciones médicas. Esta información estima una probabilidad de desarrollo de la enfermedad, pero no proporciona un diagnóstico definitivo, ya que otros genes pueden contribuir a las probabilidades de aparición de la enfermedad. Además, la consulta médica profesional sobre enfermedades complejas no puede basarse únicamente en las pruebas genéticas. Las recomendaciones médicas también deben tener en cuenta la información conductual, física, nutricional y familiar del paciente. Sobre la base de los ensayos de genotipado con tecnología de ADN, un especialista puede concluir si una persona de un determinado genotipo tiene menos o más posibilidades de desarrollar una enfermedad en relación con el riesgo medio. El diagnóstico definitivo es un derivado de la experiencia del médico y de la profundidad de la información clínica.

En la fase de desarrollo del ensayo, revisamos la literatura científica más actualizada sobre las asociaciones genéticas confirmadas repetidamente por investigaciones independientes. Limitamos nuestros ensayos de genotipado a un conjunto relativamente pequeño de marcadores genéticos porque creemos que proporcionan la información más útil e imparcial sobre la posible susceptibilidad genética a enfermedades comunes.

11. ESPECIFICACIONES

a. La especificidad del **kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA** se evaluó mediante un análisis bioinformático que utiliza las bases de datos en línea disponibles con información genética completa y actualizada. Los oligonucleótidos específicos utilizados en la prueba se cotejaron con las secuencias de la base de datos del GenBank. Ninguna de las secuencias mostró suficiente similitud para la detección inespecífica.

Interferentes en las concentraciones: bilirrubina - 684 µmol/L, hemoglobina - 2 g/L, colesterol – 13 mmol/L, triglicéridos - 37 mmol /L no afectan a la especificidad del kit.

b. En una determinación de la **sensibilidad** analítica, el **Kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA** demostró la capacidad de detectar de forma reproducible 1 o más equivalentes genómicos por reacción de PCR.

El límite inferior de detección no es inferior a 1,0 ng de ADN humano por tubo de amplificación, que corresponde a $C_p \leq 32,0$ en el canal de detección IC (Cy5). Cuando la cantidad de ADN es menor ($C_p > 32,0$ en el canal de detección IC), el fabricante no garantiza el resultado correcto del kit.

Después de la reacción de amplificación para las muestras con una cantidad insuficiente de ADN (menos de 1,0 ng por tubo de amplificación), el resultado se define como incierto.

c. Características diagnósticas

Número de muestras (n) - 635;

Sensibilidad diagnóstica (95% CI2) - 100,0% (93,9-100,0%);

Especificidad diagnóstica (95% CI) - 100,0% (99,6-100%).



Reclamaciones en las especificaciones están garantizadas cuando la extracción de ADN se realiza con **REF** kits PREP-GS Genetics **REF**/4EU o PREP-RAPID Genetics P-021/4EU.

12. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Tabla 5. Solución de problemas

	Genotipo	Posible causa	Solución
C+	-	Error de funcionamiento Inhibición de la PCR No cumplimiento de los requisitos de almacenamiento y manipulación	Repetir toda la prueba Eliminar el lote actual
C-	+	Contaminación	Eliminar el lote actual Realizar procedimientos de descontaminación
IC	-	Inhibición de la PCR Cantidad insuficiente de ADN	Repetir la prueba Volver a muestrear

Si se enfrenta a algún problema no descrito, póngase en contacto con nuestro representante en la UE o en hotline@dna-technology.ru.

13. CONTROL DE CALIDAD

"DNA-Technology Research&Production", LLC declara que los productos arriba mencionados cumplen con la disposición de la Directiva del Consejo 98/79/CE para Productos Sanitarios de Diagnóstico In Vitro. Los procedimientos de control de calidad realizados de acuerdo con la norma ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016.

Póngase en contacto con nuestro servicio de atención al cliente por problemas de calidad del **Kit de genotipado PCR en tiempo real de las mutaciones BRCA**: 115587, Moscú, Varshavskoye sh.

125g edificio 6, DNA Technology

Teléfono/Fax: +7(495) 640.17.71

Soporte técnico: +7 (800) 200-75-15, Correo electrónico: [hotline@dna-](mailto:hotline@dna-technology.ru)

[technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru), www.dna-technology.ru

Fabricante: "DNA-Technology, Research & Production" LLC

Rusia, 142281, Región de Moscú,

Protvino, calle Zheleznodorozhnaya 20,

Teléfono/fax: +7(4967) 31-06-70

Correo electrónico: protvino@dna-technology.ru

<http://www.dna-technology.ru>

Vendedor: "DNA-
Technology" LLC Rusia,

117587, Moscú

125Zh, Varshavskoe sh., bld. 6, piso 5, sala 14

Teléfono/fax: +7(495) 640.17.71

Correo electrónico: mail@dna-technology.ru

Representante autorizado en la UE:

OBELIS S.A

Dirección registrada:

Bd. Général Wahis, 53

1030 Bruselas, Bélgica

Tel: +32.2.732.59.54

Fax: +32.2.732.60.03

Correo electrónico: mail@obelis.net

<http://www.obelis.net>

14. GUIA DE SÍMBOLOS

	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Fecha de fabricación
	Temperatura límite		Consultar las instrucciones de uso
	Suficiente para		Número de catálogo
	Uso por		Fabricante
	Código de lote		Mantener alejado de la luz solar
	Precaución		Versión
	Control negativo		Control positivo
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		No reutilizar
	No estéril		



R1-H927-N3/4EU362-2.2020-02-25

