

# artus<sup>®</sup> TPMT LC PCR Kit

## Manual de uso



24 (Nr. cat. 4622063)

Diagnóstico cualitativo in vitro

para utilizar con el sistema *LightCycler*<sup>®</sup>

Abril 2007 – Versión 1



4622063



1046980ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

**MAT**

1046980ES

*artus* TPMT LC PCR Kit

Marcas comerciales y cláusulas de exclusión

QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (QIAGEN Group); *LightCycler*®, COBAS® AMPLICOR® (Roche Diagnostics).

Todos los nombres registrados, marcas comerciales, etc, usados en este documento, incluso aquellos que no estén específicamente marcados, están protegidos por la ley.

El *artus* TPMT LC PCR Kit es un kit de diagnóstico marcados con CE siguiendo la directiva europea de diagnóstico in vitro 98/79/EC. No disponible en todos los países.

Los QIAamp Kits están indicados para el uso general en el laboratorio. No están indicados para proporcionar información acerca del diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades.

La compra de kits de PCR de *artus* incluye una licencia de limitación de uso al proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aplicada al diagnóstico in vitro en humanos y veterinaria en combinación con un termociclador, cuyo uso en el proceso automatizado de la PCR está protegido por derechos de pre-pago, bien con el pago a Applied Biosystems o como compra, p. ej. de un termociclador autorizado. El proceso de la PCR está protegido por las patentes americanas enumeradas a continuación y sus equivalentes en los países correspondientes Nr. 5,219,727 y 5,322,770 y 5,210,015 y 5,176,995 y 6,040,166 y 6,197,563 y 5,994,056 y 6,171,785 y 5,487,972 y 5,804,375 y 5,407,800 y 5,310,652 y 5,994,056 propiedad de F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007 QIAGEN, todos los derechos reservados..

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Contenido</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>2. Almacenamiento</b> .....                                     | <b>4</b>  |
| <b>3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>4. Medidas generales de seguridad</b> .....                     | <b>5</b>  |
| <b>5. Información básica</b> .....                                 | <b>6</b>  |
| <b>6. Principio del ensayo</b> .....                               | <b>7</b>  |
| <b>7. Descripción del producto</b> .....                           | <b>7</b>  |
| <b>8. Protocolo</b> .....  | <b>8</b>  |
| 8.1 Purificación del ADN .....                                     | 8         |
| 8.2 Preparación de la PCR.....                                     | 8         |
| 8.3 Programación del sistema <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> ..... | 11        |
| <b>9. Análisis</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>10. Solución de problemas</b> .....                             | <b>19</b> |
| <b>11. Especificaciones</b> .....                                  | <b>20</b> |
| 11.1 Sensibilidad analítica.....                                   | 20        |
| 11.2 Especificidad analítica.....                                  | 20        |
| 11.3 Sensibilidad y especificidad diagnóstica .....                | 21        |
| <b>12. Limitaciones en la utilización del producto</b> .....       | <b>21</b> |
| <b>13. Información de seguridad</b> .....                          | <b>21</b> |
| <b>14. Control de calidad</b> .....                                | <b>21</b> |
| <b>15. Bibliografía</b> .....                                      | <b>22</b> |
| <b>16. Explicación de los símbolos</b> .....                       | <b>23</b> |

## artus<sup>®</sup> TPMT LC PCR Kit\*

Para utilizar con el sistema *LightCycler*<sup>®</sup>.

### 1. Contenido

|                 | Rotulado y contenido              | Art. No. 4622063<br>24 reacciones |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Azul</b>     | <i>TPMT LC Master A</i>           | 2 x 12 rxns                       |
| <b>Azul</b>     | <i>TPMT LC Master B</i>           | 2 x 12 rxns                       |
| <b>Amarillo</b> | <i>TPMT LC Mg-Sol<sup>†</sup></i> | 1 x 400 µl                        |
| <b>Rojo</b>     | <i>TPMT LC Control Aw</i>         | 1 x 200 µl                        |
| <b>Rojo</b>     | <i>TPMT LC Control Av</i>         | 1 x 200 µl                        |
| <b>Rojo</b>     | <i>TPMT LC Control B</i>          | 1 x 200 µl                        |
| <b>Blanco</b>   | <i>Water (PCR grade)</i>          | 1 x 1.000 µl                      |

<sup>†</sup> *Mg-Sol* = Solución de magnesio

### 2. Almacenamiento

Los componentes del *artus* TPMT LC PCR Kit deben almacenarse a -20°C y pueden ser utilizados hasta la fecha indicada en la etiqueta. Evite congelarlos y descongelarlos repetidamente (más de 2 veces), ya que puede disminuir su sensibilidad. En caso de no usarlos regularmente, es recomendable dividir los reactivos en alícuotas. Si fuera necesario almacenar los componentes a +4°C, el período de tiempo no debe superar las cinco horas.

---

\*TPMT = Tiopurina S-metiltransferasa.

### 3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios

- Guantes de laboratorio sin talco
- Kit de purificación del ADN (véase 8.1 **Purificación del ADN**)
- Pipetas (graduables)
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Agitador vortex
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, Art. No. 2 158 850) para crear un archivo *Crosstalk Color Compensation*
- Capilares *LightCycler*<sup>®</sup> (20 µl)
- Cooling Block (Bloque de refrigeración), *LightCycler*<sup>®</sup>
- Sistema *LightCycler*<sup>®</sup>
- Capping Tool, *LightCycler*<sup>®</sup>

### 4. Medidas generales de seguridad

El usuario debe tener siempre en cuenta las siguientes indicaciones:

- Por favor analice como **máximo doce muestras** por cada ensayo de PCR ya que en el análisis de más de doce muestras se pueden presentar curvas de *melting* atípicas en el caso del heterocigoto variante nt 238.
- Se deben utilizar puntas de pipeta estériles con filtro.
- Se deben purificar, almacenar y añadir a la reacción las muestras positivas (muestras, controles, amplificados) por separado del resto de reactivos.
- Todos los componentes deben descongelarse completamente a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo.
- A continuación, deben mezclarse los componentes a conciencia y centrifugarlos brevemente.
- Inmediatamente, se debe trabajar en hielo o en el Cooling Block (Bloque de refrigeración), *LightCycler*<sup>®</sup>.

## 5. Información básica

Además de la edad, sexo, alimentación y comedificación, los factores genéticos influyen especialmente en la actividad enzimática. Se sabe que pacientes con una alteración en la actividad de la enzima tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) debido a mutaciones genéticas, tienen un alto riesgo de padecer efectos secundarios (1 - 3) bajo el tratamiento con 6-tioguanina, 6-mercaptopurina o azatiopurina (por ejemplo, toxicidad hemática, toxicidad hepática, etc). Un estudio del gen TPMT permite la estimación del riesgo genético de sufrir efectos secundarios debido a la terapia. Portadores de una variante genética del gen TPMT deben ser identificados al comienzo del tratamiento y consecuentemente tratados con una terapia alternativa o con una marcada reducción del fármaco en cuestión.

La actividad enzimática de la tiopurina S-metiltransferasa se ve afectada entre otros factores por modificaciones en el gen TPMT. Modificaciones genéticas que pueden conducir por ejemplo, a un cambio de un determinado aminoácido por otro. La alteración en la conformación de la enzima influye en la actividad de la misma. Las variantes genéticas más comunes en el gen TPMT están localizadas en los nucleótidos (nt) 238, 460 y 719. Otras variantes genéticas han sido descritas en la literatura, las cuales se han observado raramente o solamente en un caso en una población. Alrededor de un 10 % de la población blanca presenta una reducción de la actividad enzimática de TPMT de un 75 %. En el 0,3 % de estos individuos la actividad enzimática no se puede determinar. Análisis comparativos entre el genotipo y el fenotipo demuestran que existe una correlación del 87 % entre el genotipo y la actividad enzimática.

El genotipado podría ayudar a llevar a cabo una medicación optimizada. El análisis del gen TPMT puede resultar de gran ayuda particularmente en el caso del tratamiento antitumoral con tiopurinas, tratamiento de enfermedades crónicas inflamatorias o tras un transplante. Este análisis permitiría reducir el costo de los tratamientos (largas estancias en el hospital, etc) que se derivan de la aparición de efectos secundarios.

## 6. Principio del ensayo

Regiones del genoma humano son amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para realizar un diagnóstico genético. En la PCR a tiempo real el producto amplificado se detecta con la ayuda de fluorocromos. Éstos están acoplados a sondas de oligonucleótidos que se van ligando específicamente a la secuencia que se amplifica. El fragmento amplificado se analiza mediante una curva de *melting* que permite la identificación y diferenciación de las variantes genéticas. Dado que no es necesario abrir los tubos de reacción tras realizar la PCR, el riesgo de contaminación se reduce considerablemente (Mackay, 2004).

## 7. Descripción del producto

El *artus* TPMT LC PCR Kit es un sistema sencillo, rápido y seguro para la detección, desde el punto de vista clínico, de las variantes genéticas relevantes del gen TPMT en el ADN humano. Este análisis, permite la estimación del riesgo de la aparición de efectos secundarios derivados del tratamiento por ejemplo, con tiopurina.

El análisis se realiza mediante la detección de las variantes genéticas en el gen TPMT con la ayuda del sistema *LightCycler*<sup>®</sup>. El kit contiene cebadores para la amplificación de fragmentos del gen TPMT humano, así como sondas marcadas con fluorocromos para la identificación de las variantes genéticas en las posiciones nucleotídicas nt 238 en el exón 5, nt 460 en el exón 7 y nt 719 en el exón 10. Paralelamente, controles positivos A (*Aw* / *Av*) y B se analizan por separado.

Dado que el análisis se basa en la amplificación del ADN genómico humano, las señales fluorescentes deben detectarse independientemente de la presencia de una variante genética. La ausencia de señal es indicativa de una purificación ineficaz del ADN o de una inhibición de la PCR. De ese modo la utilización adicional de un control interno en este ensayo no es necesaria.

**Atención:** Las señales del análisis de la curva de *melting* son decisivas para el análisis posterior de los datos. La amplificación cuantitativa durante el ensayo en el *LightCycler*<sup>®</sup> usando el *artus* TPMT LC PCR Kit no se observa en la mayoría de los casos. Esto no obstante no influye en el análisis de la curva de *melting*.

## 8. Protocolo

### 8.1 Purificación del ADN

Diversos fabricantes ofrecen kits de purificación del ADN. Ajuste la cantidad de muestra indicada para la purificación de acuerdo al protocolo que escoja, y siga las instrucciones del fabricante. Se recomienda el siguiente kit de purificación:

| Muestra | Kit de purificación            | Artículo Número | Fabricante |
|---------|--------------------------------|-----------------|------------|
| Sangre  | QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) | 51 104          | QIAGEN     |

- El *artus* TPMT LC PCR Kit no está indicado para métodos de purificación que utilizan **fenol**.
- Si lleva a cabo la purificación con tampones de lavado que contienen **etanol**, asegúrese de que se realiza una centrifugación adicional (tres minutos, 13.000 rpm) previa a la elución para eliminar posibles restos de etanol. De este modo, se evitan posibles inhibiciones de la PCR.

### 8.2 Preparación de la PCR

Por favor analice como **máximo doce muestras** por cada ensayo de PCR ya que en el análisis de más de doce muestras se pueden presentar curvas de *melting* atípicas en el caso del heterocigoto variante nt 238.

Asegúrese de que el bloque de refrigeración con los adaptadores incluidos (accesorios del sistema *LightCycler*<sup>®</sup>) se enfríe previamente a unos +4°C. Coloque el número necesario de capilares *LightCycler*<sup>®</sup> para las reacciones



que vaya a realizar en los adaptadores del bloque de refrigeración. Todos los reactivos deben descongelarse completamente a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo, también deben ser mezclados a conciencia (para ello pipetee la mezcla arriba y abajo varias veces o agite brevemente con el vortex). A continuación centrifugue brevemente.

Para cada ensayo debe añadirse los controles positivos (*TPMT LC Control Aw*, *TPMT LC Control Av* y *TPMT LC Control B*) y un control negativo (*Water*, *PCR grade*) incluidos en el *artus TPMT LC PCR Kit*.

Por favor, utilice el siguiente esquema de pipeteo para la preparación de la reacción de PCR (véase también el cuadro esquemático de la Fig. 1):

|  | Número de muestras                                      | 1            |
|--|---|--------------|
| <b>1. Preparación de la Master Mix</b> | <i>TPMT LC Master A</i><br>o<br><i>TPMT LC Master B</i> | 16 µl        |
|  | <i>TPMT LC Mg-Sol</i>                                   | 2 µl         |
|  | <b>Volumen total</b>                                    | <b>18 µl</b> |
|  | <b>2. Preparación de la PCR</b>                         |              |
|  | Master Mix  | 18 µl        |
|  | Muestra   | 2 µl         |
|  | <b>Volumen total</b>                                    | <b>20 µl</b> |

Introduzca 18 µl de la Master Mix en el depósito de plástico de cada capilar. A continuación, añada 2 µl de la purificación del ADN. Se debe utilizar como control positivo 2 µl del *TPMT LC Control A (Aw / Av)* o *B* y como control negativo 2 µl de agua (*Water*, *PCR grade*). Cierre los capilares. Para transferir la preparación del depósito de plástico a los capilares, centrifugue el adaptador con los capilares en una centrífuga de mesa durante diez segundos a un máximo de 400 x g (2.000 rpm).

**Atención:** Se debe utilizar el *LightCycler® Capping Tool*, con el fin de reducir el riesgo de contaminación al cerrar los capilares.

## Preparación de la PCR

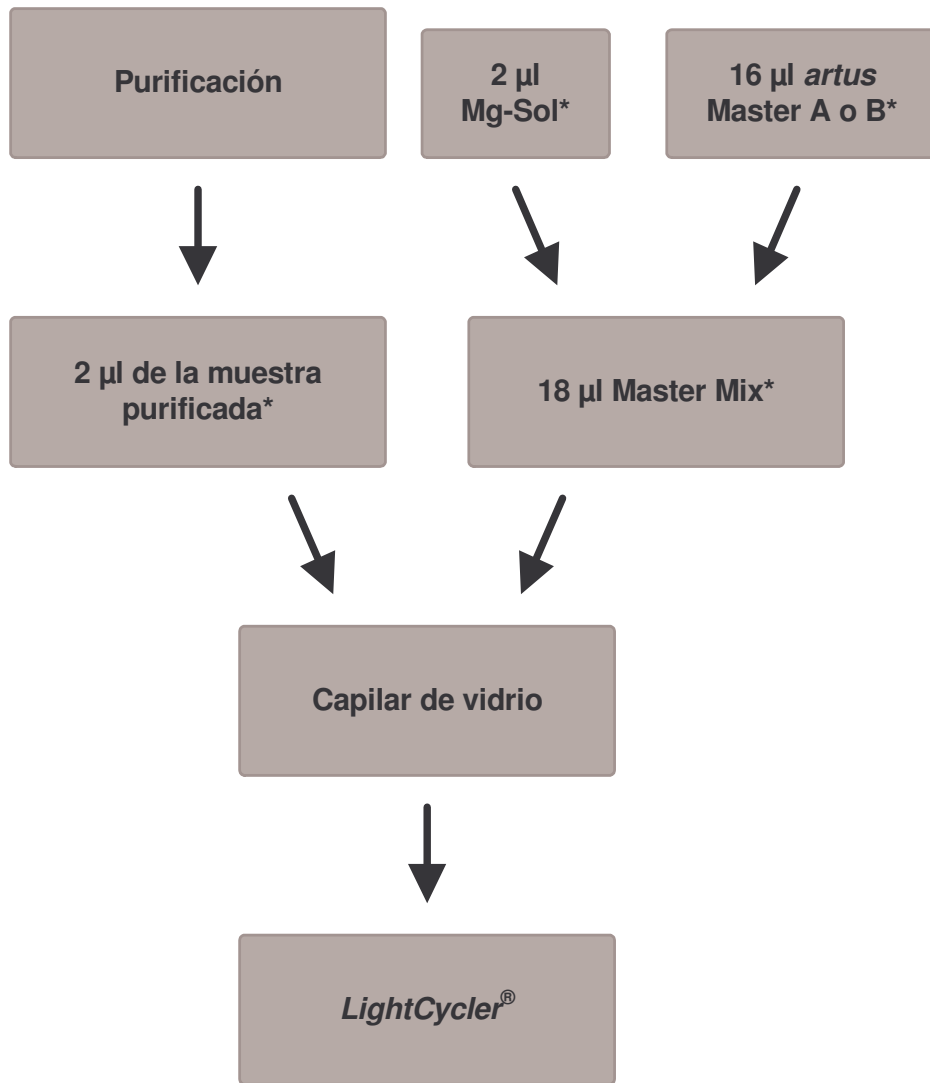


Fig. 1: Esquema de trabajo.

\* Con cada pipeteo, es imprescindible que compruebe que las soluciones utilizadas se encuentren completamente descongeladas, bien mezcladas y que hayan sido centrifugadas brevemente.

## 8.3 Programación del sistema *LightCycler*<sup>®</sup>

Para la detección de las variantes genéticas en el gen TPMT cree un perfil de temperatura en el sistema *LightCycler*<sup>®</sup> con estos cinco pasos según las Fig. 2 - 6.

- |    |   |        |
|----|---|--------|
| A. | Activación inicial de la enzima Hot Start | Fig. 2 |
| B. | Paso Touch Down                           | Fig. 3 |
| C. | Amplificación del ADN                     | Fig. 4 |
| D. | Curva de <i>melting</i>                   | Fig. 5 |
| E. | Refrigeración                             | Fig. 6 |

Preste especial atención a los ajustes *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* y *Temperature Targets*. En las figuras, estos ajustes aparecen resaltados mediante un recuadro en negrita. Encontrará más información acerca de la programación del sistema *LightCycler*<sup>®</sup> en el *LightCycler Operator's Manual*.

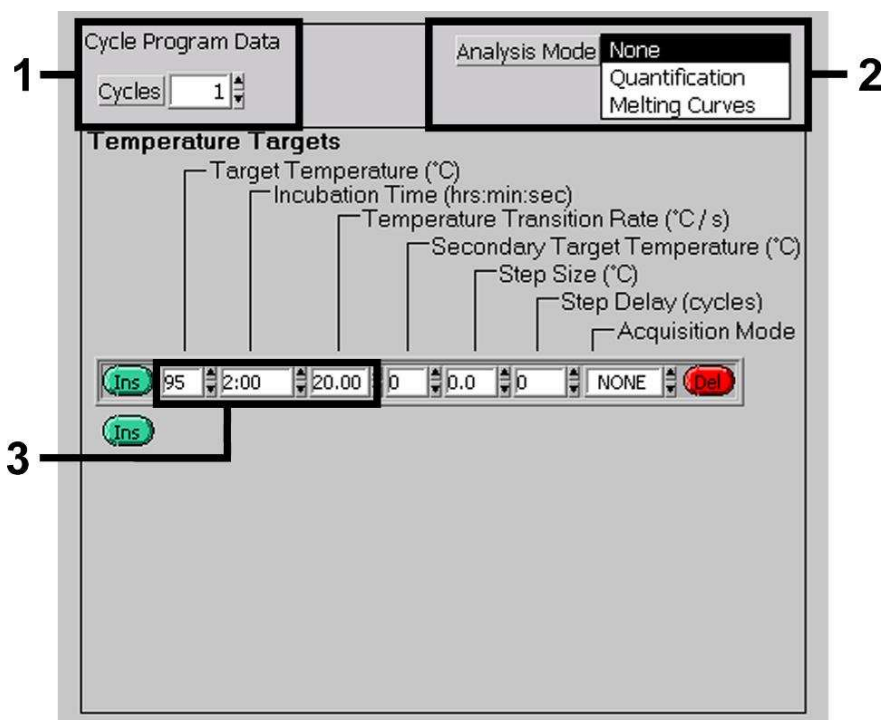


Fig. 2: Activación inicial de la enzima Hot Start.

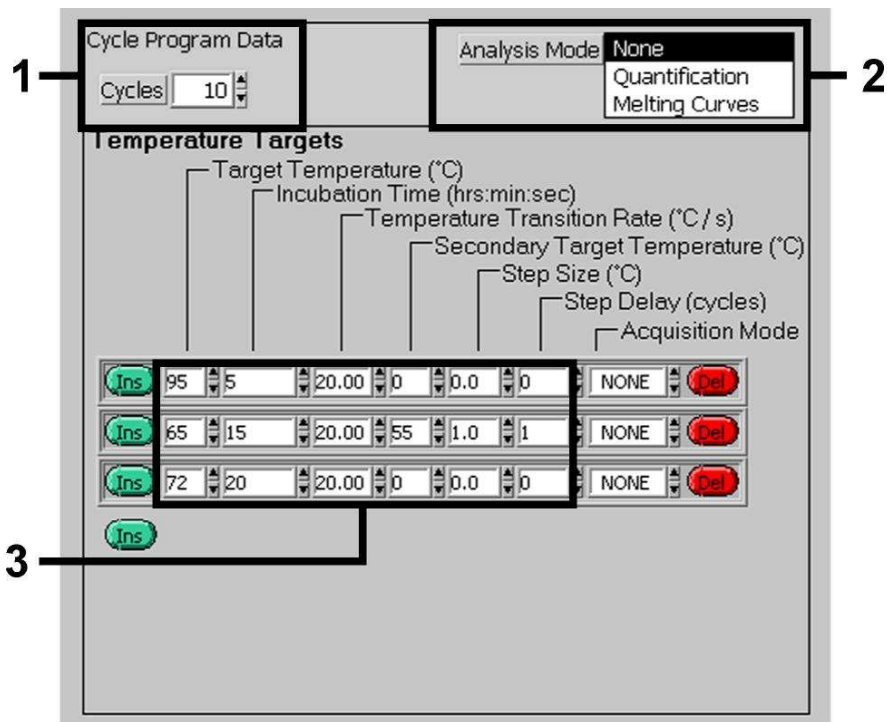


Fig. 3: Paso Touch Down.

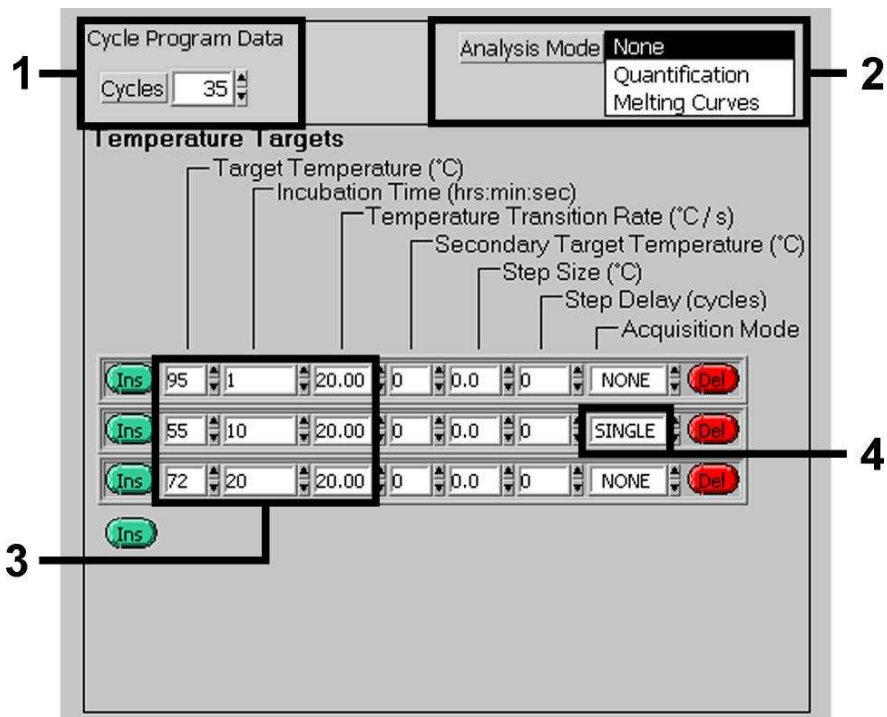


Fig. 4: Amplificación del ADN.

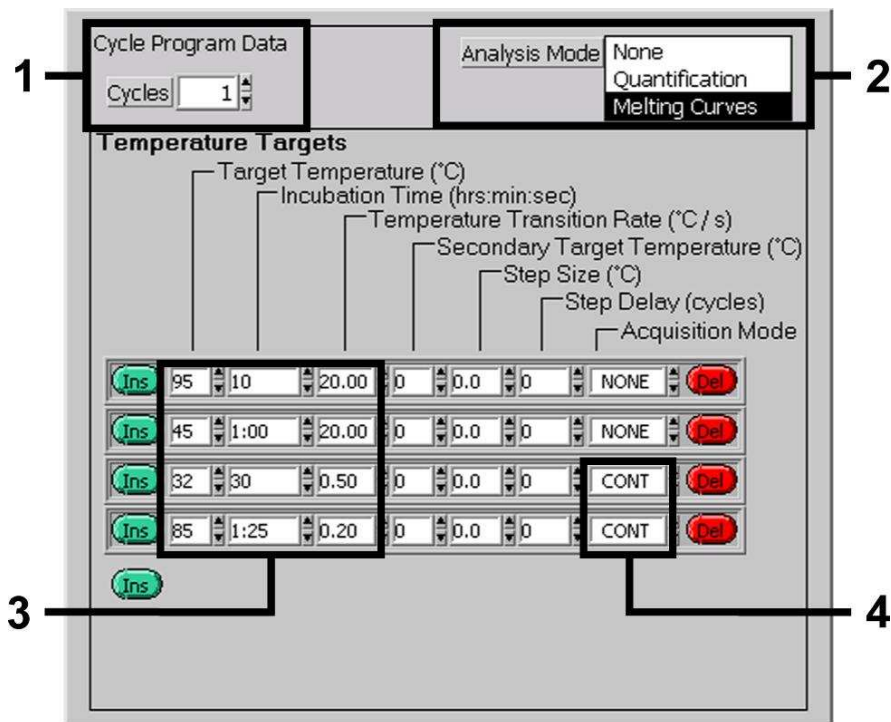


Fig. 5: Curva de *melting*.

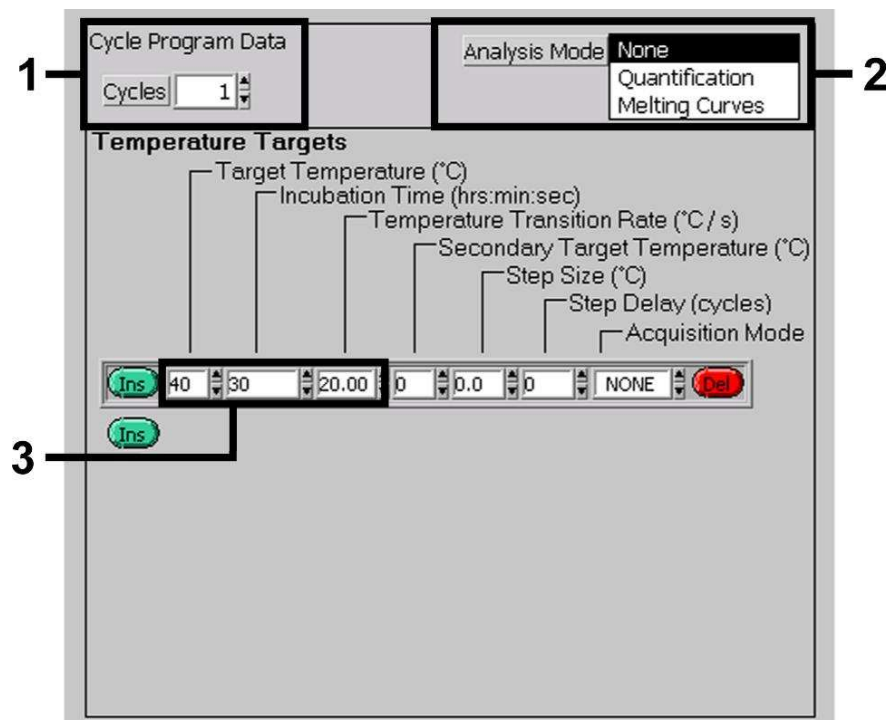


Fig. 6: Refrigeración.

## 9. Análisis

Durante los análisis con diferentes fluorocromos se producen interferencias entre los canales del fluorímetro. El software del sistema *LightCycler*<sup>®</sup> contiene un archivo llamado *Color Compensation File* para compensar estas interferencias. Abra este archivo en el transcurso o al final de la reacción de PCR activando *Choose CCC File* o pulsando *Select CC Data*. Si no se encuentra instalado ningún *Color Compensation File*, créelo usted mismo, pero por favor siguiendo las instrucciones del *LightCycler Operator's Manual*. Después de la activación del *Color Compensation File* aparecen en los canales fluorimétricos F1, F2 y F3 señales separadas. Para el análisis del resultado de la PCR usando el *artus TPMT LC PCR Kit* seleccione F2/Back-F1 y F3/Back-F1 para la PCR de TPMT. La amplificación cuantitativa durante el ensayo en el *LightCycler*<sup>®</sup> usando el *artus TPMT LC PCR Kit* no se observa en la mayoría de los casos.

Los componentes del *artus TPMT LC PCR Kit* permiten la detección de dos variantes genéticas (alelo salvaje o *wild-type* = *wt*; variante o *variant* = *var*) para las dos posiciones nucleotídicas nt 238, 460 y 719 en el gen TPMT. La determinación de las variantes genéticas se realiza con la ayuda del programa *Melting Curve*. Los puntos de *melting* en el fluorograma indican la presencia del *wild-type* o de las variantes genéticas a las temperaturas indicadas en la siguiente tabla (Tabla 1). En el caso de un heterocigoto la curva presenta dos picos.

Tabla 1: Puntos de *melting* del *wild-type* (wt) o de las variantes genéticas (var).

| Master | Canal F2 |      |      | Canal F3 |      |      |
|--------|----------|------|------|----------|------|------|
|        | nt       | wt   | var  | nt       | wt   | var  |
| A      | 238      | 54°C | 64°C | -        | -    | -    |
| B      | 460      | 57°C | 47°C | 719      | 42°C | 54°C |

Tenga en cuenta que los puntos de *melting* pueden variar  $\pm 2^\circ\text{C}$ . En algunos casos es recomendable desactivar el *Digital Filter* para obtener una mejor representación del fluorograma.

En las ilustraciones siguientes (Fig. 7 - 9) se muestran los fluorogramas de la detección de los polimorfismos en las posiciones nucleotídicas nt 238, nt 460 y nt 719 en el homocigoto *wild-type*, en el heterocigoto y en el homocigoto *variant*. Los controles positivos (*TPMT LC Control A (Aw / Av)* y *B*) incluidos en el *artus TPMT LC PCR Kit* representan el estado de heterocigoto.

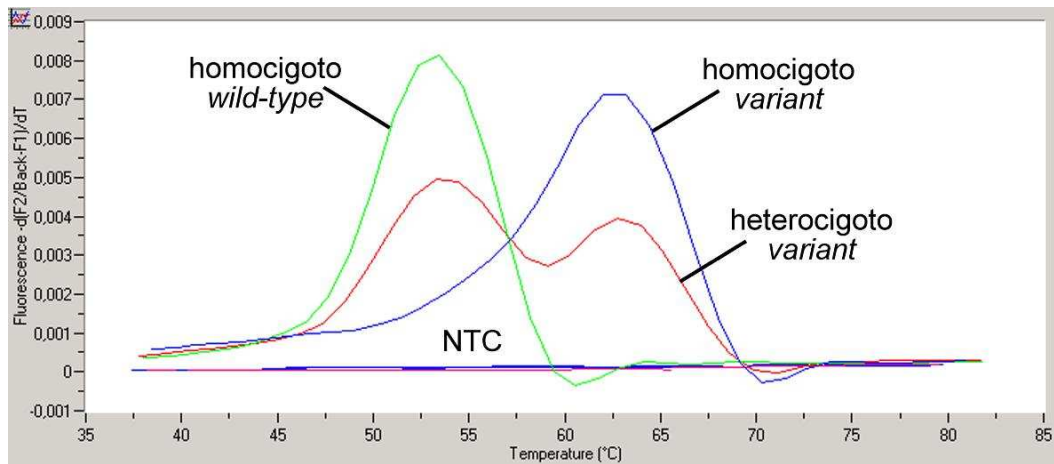


Fig. 7: Fluorograma de la detección del cambio nucleotídico en nt 238 mediante el *artus TPMT LC PCR Kit (Master A)* en el canal fluorimétrico F2/Back-F1. NTC: non-template control (control negativo).

**Atención:** Por favor analice como **máximo doce muestras** por cada ensayo de PCR ya que en el análisis de más de doce muestras se pueden presentar curvas de *melting* atípicas en el caso del heterocigoto variante nt 238.

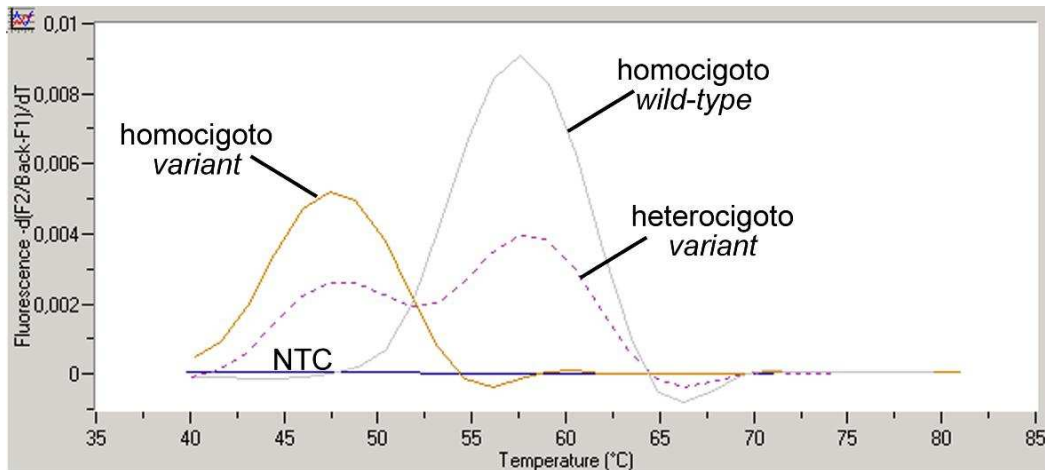


Fig. 8: Fluorograma de la detección del cambio nucleotídico en nt 460 mediante el *artus* TPMT LC PCR Kit (**Master B**) en el canal fluorimétrico F2/Back-F1. NTC: non-template control (control negativo).

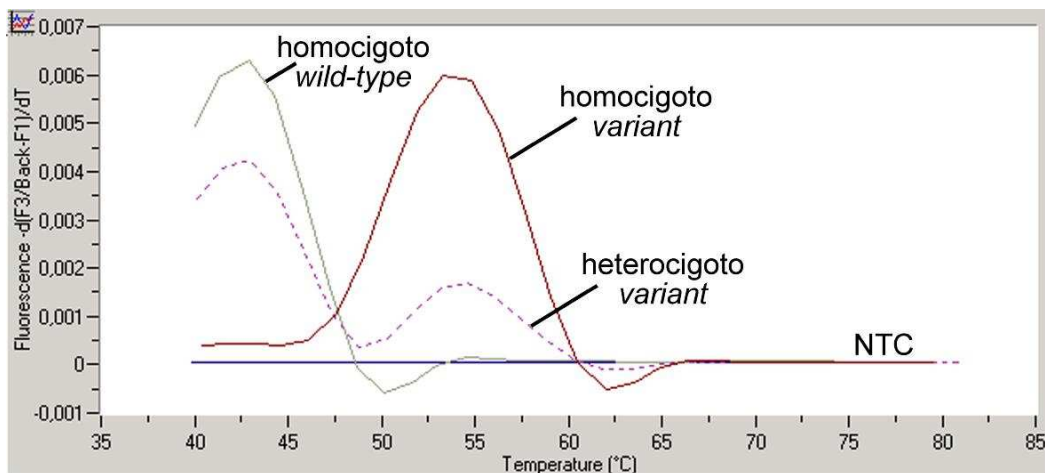


Fig. 9: Fluorograma de la detección del cambio nucleotídico en nt 719 mediante el *artus* TPMT LC PCR Kit (**Master B**) en el canal fluorimétrico F3/Back-F1. NTC: non-template control (control negativo).

El genotipo se determina por la combinación de las variantes alélicas (véase la Tabla 2). Debe tenerse en cuenta que en presencia de dos variantes heterocigotos éstos pueden estar localizados en un mismo alelo o en dos



alelos distintos. En todo caso si se encuentra por lo menos una variante genética se puede esperar una reducción en la actividad enzimática de la TPMT.

Los individuos que presentan dos alelos *wild-type* deben presentar en principio una actividad enzimática normal, a no ser que otros factores no genéticos estén implicados. Portadores de al menos uno de los alelos modificados se espera que presenten una reducción en la actividad de la enzima. Por ejemplo, la presencia de heterocigosis en las posiciones nt 460 y nt 719, conlleva a los genotipos TPMT\*3A/\*1 así como al TPMT\*3B/\*3C. Si ambos alelos están afectados el riesgo de padecer efectos secundarios inducidos genéticamente aumenta. Con el *artus* TPMT LC PCR Kit se examinan tres variantes genéticas del gen TPMT. Esto permite la detección de los siguientes alelos: TPMT\*1, TPMT\*2, TPMT\*3A, TPMT\*3B y TPMT\*3C.

Tabla 2: Variantes genéticas en el gen TPMT.

| Alelo   | nt 238<br>F2 | nt 460<br>F2 | nt 719<br>F3 | Actividad<br>enzimática |
|---------|--------------|--------------|--------------|-------------------------|
| TPMT*1  |              |              |              | normal                  |
| TPMT*2  | x            |              |              | reducida                |
| TPMT*3A |              | x            | x            | sin actividad           |
| TPMT*3B |              | x            |              | reducida                |
| TPMT*3C |              |              | x            | reducida                |

Diferentes genotipos posibles son el resultado de la combinación de estos alelos. Los genotipos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3: Influencia del genotipo en la actividad enzimática de TPMT.

| <b>Genotipo homocigoto<br/><i>wild-type</i></b> | <b>Genotipo<br/>heterocigoto u<br/>homocigoto <i>variant</i></b> | <b>Genotipo homocigoto<br/><i>variant</i></b> |
|---|--|---|
| TPMT*1/*1                                       | TPMT*1/*2  | TPMT*3A/*3A                                   |
|   | TPMT*1/*3A   |   |
|   | TPMT*1/*3B   |   |
|   | TPMT*1/*3C   |   |
|   | TPMT*2/*2  |   |
|   | TPMT*2/*3A   |   |
|   | TPMT*2/*3B   |   |
|   | TPMT*2/*3C   |   |
|   | TPMT*3A/*3B  |   |
|   | TPMT*3A/*3C  |   |
|   | TPMT*3B/*3B  |   |
|   | TPMT*3B/*3C  |   |
|   | TPMT*3C/*3C  |   |
| <b>actividad<br/>enzimática normal</b>          | <b>actividad<br/>enzimática reducida</b>                         | <b>sin actividad<br/>enzimática</b>           |

## 10. Solución de problemas

### Ausencia de señal en los controles positivos (*TPMT LC Control Aw, Av o B*) o en las muestras en el canal fluorimétrico **F2/Back-F1** o **F3/Back-F1**:

- La programación del perfil de temperatura en el sistema *LightCycler*<sup>®</sup> no se llevó a cabo correctamente.
  - Compruebe el perfil de temperatura de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase **8.3 Programación del sistema *LightCycler*<sup>®</sup>**).
- La preparación de la PCR no se llevó a cabo correctamente.
  - Compruebe el esquema de trabajo de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase **8.2 Preparación de la PCR**) y repita de nuevo la PCR si es necesario.
- No se tuvieron en cuenta las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit detalladas en **2. Almacenamiento** o el *artus* TPMT LC PCR Kit ha caducado.
  - Por favor compruebe las condiciones de almacenamiento así como la fecha de caducidad de los componentes (compruebe la etiqueta del kit) y use un nuevo kit si es necesario.
- La PCR experimentó una inhibición.
  - Asegúrese de que está utilizando uno de los métodos de purificación recomendados (véase **8.1 Purificación del ADN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.
  - Asegúrese de que durante la purificación del ADN se ha realizado el paso adicional de centrifugación para eliminar los restos de etanol antes de realizar la elución (véase **8.1 Purificación del ADN**).
- Se producen pérdidas del ADN durante la purificación.
  - Asegúrese de que está utilizando uno de los métodos de purificación recomendados (véase **8.1 Purificación del ADN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.

### Ausencia de señal de la *TPMT LC Master A* en el canal fluorimétrico **F3/Back-F1**:

- La *TPMT LC Master A* sólo genera señal en el canal F2/Back-F1.

## Curva de *melting* atípica en el análisis del resultado en el canal fluorimétrico F2/Back-F1 en el caso del cambio nucleotídico nt 238:

- Se han analizado más de doce muestras en un ensayo de PCR.

### Pico de fluorescencia débil

- Mezcle los bien todos los componentes antes de usarlos.
- Compruebe las condiciones de amplificación.
- Enfríe el bloque de refrigeración incluidos los adaptadores a aproximadamente +4 °C.
- Mantenga en frío los componentes durante todo el pipeteo.

Para cualquier duda o consulta, póngase por favor en contacto con nuestro servicio técnico.

## 11. Especificaciones

### 11.1 Sensibilidad analítica

El *artus* TPMT LC PCR Kit permite la detección de la constitución genética individual respecto a las variantes nt 238, nt 460 y nt 719 en el gen humano TPMT mediante la tecnología *LightCycler*<sup>®</sup>. Se purificó el ADN genómico humano de muestras de sangre, se cuantificó mediante espectrofotometría y se realizaron diluciones seriadas. Un mínimo de 0,12 ng de ADN genómico (20 copias) por PCR (correspondientes a 0,005 - 0,02 µl de sangre, depende del donante y purificación), son suficientes para la detección de la variante genética.

### 11.2 Especificidad analítica

La esmerada selección de los cebadores y sondas junto con las más rigurosas condiciones de reacción garantizan la especificidad del *artus* TPMT LC PCR Kit. Los cebadores y sondas se controlaron mediante un análisis de comparación de secuencias, en cuanto a posibles homologías con otras secuencias conocidas. De este modo, la especificidad de la detección de este polimorfismo genético está asegurada por la secuenciación de cada

una de las variantes alélicas y su comparación con bancos de datos internacionales.

### **11.3 Sensibilidad y especificidad diagnóstica**

La frecuencia de los polimorfismos en la población caucasiana, descrita en la literatura, fue confirmada usando 300 muestras de ADN y los componentes del kit.

## **12. Limitaciones en la utilización del producto**

- Todos los reactivos deben utilizarse exclusivamente para el diagnóstico in vitro.
- El producto sólo debe ser utilizado por personal cualificado y con la formación necesaria para realizar diagnósticos in vitro (EN375).
- Es imprescindible cumplir con el protocolo para conseguir resultados de la PCR óptimos.
- Preste atención a las fechas de caducidad que aparecen en la caja y en las etiquetas de cada uno de los componentes. No utilice reactivos caducados.

## **13. Información de seguridad**

Información de seguridad respecto al *artus* TPMT LC PCR Kit puede encontrarla en la hoja de seguridad (material safety data sheets, MSDS). Puede descargar dicha hoja en cómodo formato PDF bajo la dirección [www.qiagen.com/support/msds.aspx](http://www.qiagen.com/support/msds.aspx).

## **14. Control de calidad**

En conformidad con la certificación ISO 9001 e ISO 13485 del sistema de gestión de la calidad de QIAGEN, cada lote del *artus* TPMT LC PCR Kit fue testado respecto a especificaciones establecidas para garantizar la calidad constante del producto.

## 15. Bibliografía

- (1) Andersen JB, Szumlanski C, Weinshilboum RM, Schmiegelow K. Pharmacokinetics, dose adjustments, and 6-mercaptopurine/methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. *Acta Paediatr.* 1998 Jan; 87 (1): 108 - 11.
- (2) Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Feb 14; 92 (4): 949 - 53.
- (3) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 – 212.
- (4) Schwab M, Schaffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, Gregor M, Eichelbaum M, Zanger UM, Kaskas BA. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics.* 2002 Aug; 12 (6): 429 - 36.

## 16. Explicación de los símbolos



Fecha de caducidad



Número de lote



Fabricante



Número de catálogo



Número de manual de uso



Manual de uso



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Contiene suficiente para <N> tests



Límite de temperatura

**Mg-Sol**

*Solución de magnesio*











**Austria ■ QIAGEN Vertriebs GmbH ■ Löwengasse 47/6 ■ 1030 Wien**

Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

**Canada ■ QIAGEN Inc. ■ 2800 Argentia Road ■ Unit 7 ■ Mississauga ■ Ontario ■ L5N 8L2**

Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**France ■ QIAGEN S.A. ■ 3 avenue du Canada ■ LP 809 ■ 91974 COURTABOEUF CEDEX**

Orders 01-60-920-920 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930

**Germany ■ QIAGEN GmbH ■ QIAGEN Strasse 1 ■ 40724 Hilden**

Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

**Italy ■ QIAGEN S.p.A. ■ Via Grosio, 10/10 ■ 20151 Milano**

Orders 02-33430-411 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

**Japan ■ QIAGEN K.K. ■ Forefront Tower II ■ 13-1, Kachidoki 3 Chome ■ Chuo-ku, Tokyo 104-0054**

Telephone 03-5547-0811 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-5547-0811

**Switzerland ■ QIAGEN AG ■ Garstligweg 8 ■ 8634 Hombrechtikon**

Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

**USA ■ QIAGEN Inc. ■ 27220 Turnberry Lane ■ Valencia ■ CA 91355**

Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1046980ES 127132194