



PROPÓSITO DE USO

El kit gb PHARM DPYD permite el genotipado de ADN para polimorfismos en el gen que codifica DPYD:

Alelo	ID SNP	Variante WT	Variante MUT
*2A (c1905+1G>A)	rs3918290	G	A
*13 (c1679T>G)	rs55886062	T	G
HapB3 (c1236G>A)	rs56038477	G	A
c2846A>T	rs67376798	A	T

La enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) descompone el quimioterapéutico 5-fluorouracilo en metabolitos no tóxicos. La actividad enzimática afecta a la incidencia de los efectos adversos del tratamiento del cáncer. El kit se utiliza para la determinación del genotipo de cuatro polimorfismos según las directrices CPIC y DPWG: *2A (c1905+1G>A), *13 (c1679T>G), HapB3 (c1236G>A) a c2846A>T en el ADN del genoma humano.

U. Amstutz et al., Clin. Pharmacol. Ther. 103, 210–216 (2018).

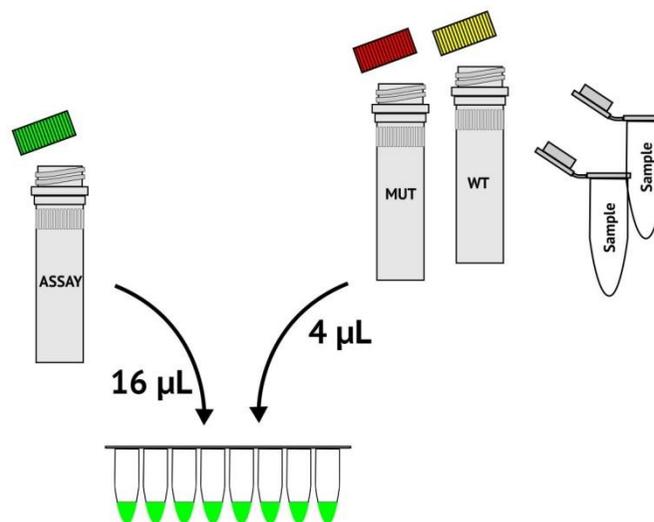
C. A. T. C. Lunenburg et al., Eur. J. Hum. Genet. 28, 508–517 (2020).

PRINCIPIO DEL TEST

El principio de detección se basa en la PCR en tiempo real mediante sondas marcadas con fluorescencia (discriminación alélica). El kit contiene todos los componentes necesarios para realizar la determinación.

INSTRUCCIONES DE USO

- 1) Saque de la caja el número correspondiente de alícuotas de reactivos y déjelas descongelar completamente.
- 2) Mexcle bien los reactivos y centrifugue brevemente.
- 3) Dispense el ensayo de detección con **16 µl** en microtubos o en placas de pocillo.
- 4) Anada **4 µl** of a template al ensayo y centrifugue brevemente.
 - Cada prueba individual requiere el **análisis estándar de WT y MUT**. Para realizar una evaluación correcta, se recomienda el análisis del estándar HET y el análisis del agua desionizada como control NTC.
 - El kit está destinado a la detección de mutaciones en el ADN genómico. La cantidad total de ADNg en una reacción debe estar entre 8-400 ng, lo que equivale a la concentración de la muestra de entrada de **2-100 ng/µl**.



- 5) Realice el análisis de la muestra inmediatamente después de la preparación de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción puede conservarse en frigorífico durante 1 hora como máximo antes de introducirla en el ciclador.

Protocolo de amplificación y recogida de datos

- Configure el termociclador PCR en el siguiente perfil de temperatura:

desnaturalización inicial	95 °C	3 mins	50 cycles
desnaturalización	95 °C	10 sec	
recocido + alargamiento (+ adquisición de fluorescencia)	60 °C	20 sec	

- El volumen total de una reacción PCR es de 20 µl; tenga en cuenta este dato al configurar el ciclador.
- Cuando se utiliza el instrumento Rotor-Gene, es necesario ajustar una ganancia idéntica para ambos canales, de modo que la fluorescencia básica sea inferior a 5 RFU.
- La adquisición de fluorescencia debe estar activada para los canales FAM/SYBR y HEX/JOE/VIC.
- Si su instrumento lo requiere, seleccione el modo de Discriminación Alélica antes de iniciar una ejecución.
- Las instrucciones para configurar un ciclador se pueden encontrar en el sitio web:

ANÁLISIS DE RESULTADOS

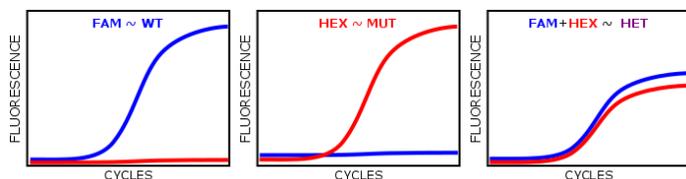
Verifique primero la validez del análisis. Visualice las señales de las muestras de control con el ensayo de detección respectivo en modo de cuantificación. La validez del análisis debe evaluarse para **cada mutación por separado**.

Validez del análisis

El análisis se considera válido cuando las señales de control se corresponden con el siguiente esquema:

- Señal estándar WT- en el canal FAM/SYBR
- Señal MUT- estándar en canal HEX/JOE/VIC
- HET estándar: señal en los canales FAM/SYBR y HEX/JOE/VIC
- Agua desionizada - sin señal

Ejemplo de salida de controles positivos para genotipos individuales: señales en los canales FAM/SYBR (curva azul) y HEX/JOE/VIC (curva roja):



Si el análisis es válido, continúe con la evaluación del genotipo de las muestras. En caso contrario, siga las recomendaciones indicadas en el capítulo Resolución de problemas.

Evaluación de genotipos de muestras individuales

La determinación del genotipo para la mutación respectiva de una muestra de ADN analizada debe realizarse utilizando el software de su cicladora de PCR en tiempo real. Evalúe siempre cada mutación por separado. Para las plataformas más comunes, recomendamos los siguientes procedimientos:

Interpretación de los resultados

El resultado final del análisis es determinar un genotipo - tipo salvaje (WT), mutante (MUT) o heterocigoto (HET) para rs3918290 (c1905+1G>A), rs55886062 (c1679T>G), rs56038477 (c1236G>A) y rs67376798 (c2846A>T).

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Los resultados de las pruebas sólo pueden considerarse correctos si se siguen las instrucciones indicadas en el manual adjunto. Cuando las muestras de control den resultados incorrectos, compruebe lo siguiente:

- la fecha de caducidad del kit
- las condiciones de almacenamiento y manipulación
- los ajustes de la pipeta y del ciclador

Hallazgo:	Posible motivo y medidas correctoras:
Se detecta una señal baja en el canal incorrecto para el estándar homocigótico (WT, MUT).	El estándar emite una señal inespecífica que puede interpretarse en algunos cicladores como un resultado positivo (heterocigoto). Aumentar el Umbral justo por encima de la señal inespecífica para poder genotipar el estándar correctamente.
Se detecta una señal en la reacción de control negativo.	Lo más probable es que las reacciones fueran contaminado con una plantilla. Repita el análisis.
En la reacción de control negativo, se detecta repetidamente una señal mediante el mismo ensayo de detección.	Lo más probable es que el ensayo se haya contaminado con una plantilla. Repita el análisis con una nueva alícuota del ensayo.
En la reacción de control negativo, todos los ensayos de detección detectan repetidamente una señal.	Lo más probable es que el componente Agua desionizada estuviera contaminado con una plantilla. Repita el análisis con una nueva alícuota del agua de calidad PCR.
El control positivo no se detectó o sólo se detectó en el canal incorrecto.	Probablemente se ha producido un error de pipeteo. Repita el análisis.
Se detecta una señal con Ct > 32 en la muestra examinada.	Compruebe que la concentración de la muestra de entrada se encuentra dentro del intervalo recomendado. Si no es así, prepare un nuevo aislado de ADN.
La muestra examinada emite una señal baja.	Verifique que la concentración de la muestra de entrada se encuentra dentro del rango recomendado. En caso afirmativo, diluya la muestra hasta que casi alcance el valor inferior del intervalo de concentración recomendado. En caso contrario, prepare una nueva ADN aislado.
La muestra examinada no asignado un genotipo.	Realizar el análisis con un nuevo ADN aislar.
No se midió ninguna señal para la muestra examinada, aunque el análisis se evaluó como válido.	Realice el análisis con un nuevo aislado de ADN.

CONTENIDO Y DESCRIPCIÓN DE LOS COMPONENTES DEL KIT

Componente ¹⁾	Importe	CANT. ²⁾	Concentración
 Ensayo DPYD*2A (c1905+1G>A)	0,4 ml	1	1.25x
 Ensayo DPYD*13 (c1679T>G)	0,4 ml	1	1.25x
 Ensayo DPYD HapB3 (c1236G>A)	0,4 ml	1	1.25x
 Ensayo DPYD c2846A>T	0,4 ml	1	1.25x
 Estándar WT DPYD	0,2 ml	1	1E4 cop/μl
 Estándar MUT DPYD	0,2 ml	1	1E4 cop/μl
 Estándar HET DPYD	0,2 ml	1	1E4 cop/μl
 Agua desionizada	1,0 ml ³⁾	1	

¹⁾ El color de la tapa se corresponde con el tipo de reactivo.

²⁾ Número para tamaño de kit de 25 rxn.

³⁾ 0,4 ml equivalen a 25 reacciones PCR de 20 μl de volumen.

⁴⁾ Concentración global de copias WT y MUT en proporción 1:1.

Ensayo qPCR

El ensayo qPCR es una mezcla de cebadores de amplificación, sondas marcadas con fluorescencia específicas de un alelo normal y mutado, un tampón, nucleótidos y una polimerasa. El ensayo se suministra en microtubos con tapón verde.

El ensayo contiene sondas específicas para cada variante de polimorfismo. En el caso de la variante WT, la sonda está marcada con el fluoróforo FAM ($\lambda_{\text{EXCITACION}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISSION}} = 520 \text{ nm}$), en el caso de la variante MUT con el fluoróforo HEX ($\lambda_{\text{EXCITACION}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISSION}} = 556 \text{ nm}$). En caso de presencia de ambas variantes del gen, mutada y no mutada, es posible registrar dos señales, mientras que en caso de presencia de sólo una de las variantes (WT, o MUT) sólo se puede registrar una única señal. Este método de detección se denomina discriminación alélica.

Estándar

Los estándares sirven como controles positivos para verificar la validez del análisis y establecer los parámetros de evaluación. El estándar WT con la tapa amarilla representa el genotipo homocigoto de tipo salvaje, el estándar MUT con la tapa roja representa el homocigoto mutado y el estándar HET con la tapa violeta contiene el genotipo heterocigoto.

Agua desionizada

El agua desionizada sirve como control sin plantilla (NTC). Se recomienda su uso. Se suministra en un microtubo con tapa transparente.

Reactivos y material no incluidos en el kit

- kit o reactivos para el aislamiento de ADNg a partir de material clínico
- microtubos, tiras o placas de plástico de un solo uso, cómodos para usar en el ciclador PCR
- micropipetas ajustables con el rango correspondiente
- puntas de pipeta desechables con filtro
- vortex y centrifugadora de laboratorio
- ciclador PCR en tiempo real con software

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Condiciones de almacenamiento y manipulación

- Almacenar todos los componentes del kit a una temperatura inferior a **-20 °C**.
- El ensayo qPCR es fotosensible; por lo tanto, limite su manipulación a la luz al menor tiempo posible.
- Los componentes individuales del kit pueden descongelarse y congelarse repetidamente **5 veces como máximo**.
- Los reactivos están diseñados para trabajar a temperatura de laboratorio.
- Si se siguen las condiciones mencionadas, el kit es estable hasta su fecha de caducidad indicada en la **etiqueta de la caja**.

Medidas de seguridad

- El kit está diseñado exclusivamente para uso profesional.
- Cuando trabaje con reactivos y material de qPCR, lleve siempre ropa de laboratorio y guantes de seguridad.
- En caso de contacto de los reactivos con la piel o los ojos, enjuague la zona afectada con agua corriente.

Instrucciones de uso

- Utilice siempre la versión adjunta del manual. El número de versión correspondiente está marcado en la etiqueta del interior de la caja.
 - La manipulación inadecuada de los reactivos o los ajustes del flujo de trabajo pueden influir negativamente en los resultados, por lo que es necesario seguir estrictamente los volúmenes de pipeteo, los tiempos de incubación y las condiciones de temperatura que se indican en el manual.
 - Respete la fecha de caducidad del kit indicada en la etiqueta de la caja.
 - No combine componentes de diferentes lotes del kit.
 - Si alguno de los componentes del kit está dañado al recibirlo, no lo utilice y póngase en contacto con el fabricante inmediatamente. Conserve el componente a efectos de una eventual reclamación.
 - Utilice pipetas e instrumentos calibrados.
 - Elimine todos los residuos de acuerdo con la legislación vigente. El embalaje exterior es de papel, el segmento interior de poliuretano y los microtubos de polipropileno. Los reactivos pueden manipularse como residuos comunes. Elimine el producto final del análisis PCR teniendo en cuenta el riesgo de contaminación del espacio de trabajo.
- #### Precauciones contra la contaminación
- Asignar espacios, equipos, material y equipos de protección específicos para el aislamiento de ADN a partir de material clínico, y otros diferentes para la preparación de la PCR.
 - Cámbiese los guantes y la ropa de protección siempre que sospeche que hay contaminación.
 - Nunca abra un producto de PCR amplificado en el lugar donde se prepara la PCR.
 - Deje los reactivos abiertos sólo el tiempo necesario para preparar las reacciones de PCR.
 - Utilice puntas con filtro al pipetear.
 - Al preparar una mezcla de reacción, tenga cuidado de no contaminar ningún otro componente del kit, u otras muestras, con el control positivo. Esto puede evitarse cerrando todos los microtubos antes de manipular un control positivo.
 - Utilice agua ultralimpia para la dilución de la muestra; el agua desionizada suministrada con el kit puede utilizarse para este fin.

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS

	Código de lote
	Fecha de caducidad
	Conservar a la temperatura recomendada
	Contiene
	Fabricante
	Número de pruebas

REFERENCIAS

Cuando utilice el kit, siga el manual del fabricante del ciclador. La lista de cicladoras en las que se han probado los parámetros de rendimiento del kit está disponible en el sitio web del fabricante.

Si desea más información, póngase en contacto con nosotros en nuestra dirección de correo electrónico: info@generi-biotech.com o por teléfono: +420 495 056 314. También puede encontrar más información en nuestro sitio web www.generi-biotech.com.



GENERI BIOTECH s.r.o.
Machkova 587/42
CZ-500 11, Hradec Kralove - Trebes
REPÚBLICA CHECA

www.generi-biotech.com

Teléfono +420 495 056 314

Correo electrónico: info@generi-biotech.com

Versión del manual: 2.0

Fecha de la última revisión: 16. 9. 2021

Versión manual: 2.0