



imegen

Bringing
genomics
to health

Instrucciones de uso

imegen[®] Cambridge II

Genotipado de la mutación p.Ala368Ser del gen *SERPINC1* (antitrombina) mediante PCR a tiempo real

REF IMG-199

Fabricado por:

Instituto de Medicina Genómica SL
Agustín Escardino 9,
Parc Científic de la Universitat de València
46980 Paterna (Valencia, España)
+34 963 212 340 - info@imegen.es

imegen.es

Rev. 1. 12/02/2019



ISO 9001

BUREAU VERITAS
Certification

N° ES063227-1



imegen

Imegen le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación.

Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

Nuestros productos están diseñados para uso en investigación. Imegen no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Imegen, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. Imegen no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit **imegen[®] Cambridge II** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

Teléfono: 963 212 340
e-Mail: tech.support@imegen.es

imegen[®] es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España

Modificaciones de las Instrucciones de Uso [IFU]	
Versión 01	Revisión de contenido.



imegen

Índice

1. Información general	4
2. Uso previsto	5
3. Advertencias y precauciones de seguridad	6
4. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	7
5. Equipos y materiales necesarios que no se suministran	8
6. Protocolo de ensayo	9
6.1 Preparación de las reacciones de amplificación	9
6.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real	9
7. Análisis de los resultados	11
8. Troubleshooting	12
9. Limitaciones	13
9.1 Analíticas	13
9.2 Equipos	13
9.3 Reactivos	13
9.4 Estabilidad del producto	13



1. Información general

El síndrome Cambridge II es un tipo de trombofilia hereditaria con predisposición a la trombosis que provoca deficiencia de la enzima antitrombina, AT, involucrada en el proceso de coagulación sanguínea. La enzima AT, de síntesis hepática, está codificada por el gen *SERPINC1* que pertenece a la superfamilia de las serpinas y se caracteriza por su actividad inhibidora de enzimas con actividad serín proteasa. La AT es responsable de la regulación de la formación del coágulo ya que inhibe la actividad de la trombina y de otras proteínas que promueven la coagulación e interfiere en los primeros pasos de las cascadas de coagulación.

La AT es el principal anticoagulante endógeno, pues inhibe a la enzima procoagulante más importante, la trombina [FIIa], y a otras enzimas de la coagulación como son los factores Xa, IXa, XIa y XIIa. La deficiencia incluso moderada de la molécula aumenta el riesgo trombótico hasta un 50%, y la deficiencia completa de la proteína está asociada con la letalidad embrionaria. Por todo ello, la AT es quizás el principal elemento regulador del sistema hemostático con mayor trascendencia funcional.

La variante Cambridge II, A368S, afecta la función de la AT, alterando su capacidad de inhibición de factores de coagulación y trombina con respecto a la forma no mutada, incrementando considerablemente el riesgo de trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

Referencias

- Khan S, Dickerman JD. Hereditary thrombophilia. *Thromb J. BioMed Central*; 2006;4: 15.
- Williamson D, Brown K, Luddington R, Blood CB-, 1998 undefined. Factor V Cambridge: a new mutation [Arg306→ Thr] associated with resistance to activated protein C. *Am Soc Hematol*.
- <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SERPINC1>



imegen

2. Uso previsto

El kit **imegen-Cambridge II** emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes [FAM[™] y VIC[®]] en un ensayo de PCR a tiempo real validado para analizar el genotipo de un paciente en la posición 1246 del gen SERPINC1 cuya mutación c.1246G>T o p.[Ala416Ser] afecta a la proteína antitrombina dando lugar al fenotipo conocido como Cambridge II. Esta nomenclatura, que sigue las indicaciones de la HGSV, está basada en el NM_000488.3. Por otro lado, a esta mutación, también se le asigna, tradicionalmente y según la entrada 0027 del OMIM *107300, la siguiente nomenclatura: mutación ALA384SER del gen SERPINC1.

Este kit ha sido validado utilizando muestras procedentes de la Unidad de Genética Médica de imegen. El material necesario para este estudio es ADN genómico procedente de sangre periférica, saliva o frotis bucal. La cantidad total de ADN necesario es de 50 ng.

Imegen-Cambridge II es sólo para uso en investigación y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.



imegen

3. Advertencias y precauciones

1. Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
2. No pipetear con la boca.
3. No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
4. Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
5. No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
6. En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
7. Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
8. Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
9. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
10. Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.



4. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 48 determinaciones. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- Cambridge II Master Mix: Contiene oligonucleótidos, sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM y VIC) y agua para la amplificación y detección de los alelos normal y/o mutante objeto de análisis.
- General Master Mix: Master Mix de PCR con los nucleótidos, $MgCl_2$, enzima y buffer para llevar a cabo la PCR a tiempo real.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
Cambridge II Master Mix	Disco rojo	2 x 180 μ L	-20°C
General Master Mix	Disco blanco	2 x 300 μ L	4°C

Tabla 1. Componentes del kit imegen-Cambridge II



imegen

5. Equipos y materiales no suministrados

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real (canales FAM y VIC)
- Micropipetas de 10 μ L, 20 μ L y 200 μ L
- Vortex
- Centrífuga

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Material fungible óptico compatible con el termociclador de PCR a tiempo real
- Guantes de látex



6. Protocolo de ensayo

6.1 Preparación de las reacciones de amplificación

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

Para llevar a cabo el análisis cualitativo, se recomienda preparar una reacción de amplificación por muestra e incluir un control negativo de PCR, para descartar contaminación de los reactivos y el control positivo.

A continuación, se muestra el protocolo recomendado para la preparación de las reacciones de amplificación:

1. Descongelar todos los reactivos del kit y el ADN de las muestras. Agitar cada uno de los reactivos en vortex y mantener en frío.
2. En un tubo de 1.5 mL preparar el mix de PCR añadiendo los siguientes reactivos por muestra:

Reactivos	Cantidad por reacción
Cambridge II Master Mix	7.5 μ L
General Master Mix	12.5 μ L

3. Agitar en vortex y dar spin al mix de PCR y dispensar 20 μ L en los correspondientes pocillos del material fungible óptico.
4. Añadir 5 μ L de las muestras diluidas a una concentración de 10 ng/ μ L y 5 μ L de agua libre de nucleasas [control negativo] a los pocillos correspondientes.
5. Colocar los tubos o placas en el termociclador de PCR a tiempo real y configurar el programa de amplificación tal y como se indica en el siguiente apartado.

6.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real

- Tipo de experimento: Quant-Standard
- Velocidad de rampa: Standard
- Volumen de reacción: 25 μ L
- Referencia basal ROX™: incluida



imegen

- Fluoróforos de las sondas de hidrólisis:

Sonda	Fluoróforo	Genotipo	Quencher
A384SER-P	VIC®	Mutante	MGB
A384ALA-P	FAM™	Normal	MGB

Tabla 2. Información de las sondas de hidrólisis.

- Programa óptimo de PCR:

Campos	Etapa 1	Etapa 2	
	Activación enzimática	PCR	
Nº de Ciclos	1 ciclo	50 ciclos	
		Desnaturalización	Unión de oligonucleótidos/ Extensión
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tiempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto*

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne (Thermo Scientific)

*Detección de la fluorescencia

7. Análisis de resultados

Para un correcto análisis de los resultados se recomienda seguir las siguientes indicaciones:

- Comprobar que en el control negativo de PCR no hay amplificación, ni en el canal FAM ni en el canal VIC.
- Para analizar las muestras hay que emplear un software específico del termociclador de PCR a tiempo real utilizado.

A continuación se muestran los posibles resultados obtenidos con el kit **imegen-Cambridge II**.

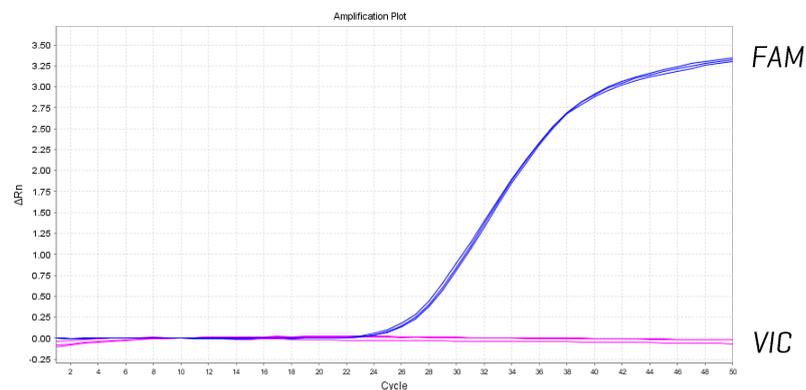


Figura 1. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal [G/G]. Sólo se observa amplificación en el canal FAM.

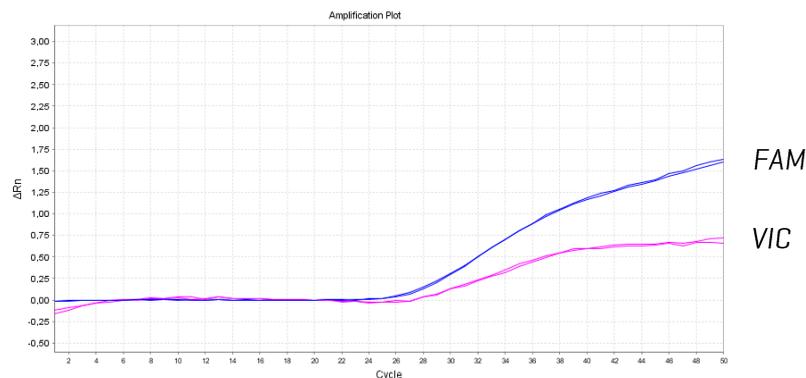


Figura 2. Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota [G/T]. Se observa señal en ambos canales, FAM y VIC, siendo la intensidad de fluorescencia mayor en el canal FAM.

El genotipo T/T resultaría en una señal de amplificación en el canal VIC.



8. Troubleshooting

La tabla que aparece a continuación presenta gráficamente los resultados que podrían obtenerse del análisis de los diferentes controles y una muestra en un ensayo, así como su interpretación:

Control y Muestras	Resultado		Causa
	FAM	VIC	
Muestras	+	+	Resultado esperado
	+	-	
	-	+	
	-	-	Fallo de amplificación de la muestra ¹
Control Negativo de PCR	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con ADN humano ²
	+	-	
	-	+	

Tabla 4. Interpretación de los posibles resultados

¹ **Fallo de amplificación de la muestra:** Compruebe que la cuantificación de la muestra es la recomendada, si fuese así el resultado especificado puede deberse a que la muestra se encuentre altamente degradada.

² **Contaminación de la PCR con ADN de humano:** La contaminación de la PCR puede deberse a un manejo equivocado de la muestra, al uso de reactivos contaminados o a contaminación de origen ambiental. Limpie minuciosamente el laboratorio donde se ha preparado la PCR, así como los equipos y el material utilizados. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR. Prepare en último lugar la reacción de PCR que contiene el control positivo, con el fin de evitar la contaminación cruzada. En este caso se recomienda repetir el ensayo.



imegen

9. Limitaciones

10.1 Analíticas

imegen-Cambridge II no puede detectar la presencia de otros alelos, como por ejemplo, GCTCCAAGT.

10.2 Equipos

imegen-Cambridge II ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- 7500 FAST Real-Time PCR System [ThermoFisher Scientific]
- StepOne Real-Time PCR System [ThermoFisher Scientific]
- StepOne Plus Real-Time PCR System [ThermoFisher Scientific]

Si usa otra marca o modelo de termocicladores, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro servicio técnico para cualquier consulta o aclaración.

10.3 Reactivos

imegen-Cambridge II se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual [Equipos y materiales necesarios que no se suministran].

10.4 Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.