

adellgene

Huntington Disease

INSTRUCCIONES DE USO

Kit para la determinación del número de tripletes CAG del gen HD,
mediante análisis de fragmentos fluorescentes

Rv. 01 / 14-06-2017

CE

Referencia AD-HD-16

Conservar de -18°C a -30°C



BDR

BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES

Índice

Uso	3
Información general	4
Principios del procedimiento	6
Contenido del kit	7
Almacenamiento del kit	8
Material necesario no suministrado	9
Recolección y preparación de muestras	10
Procedimiento de uso	11
Resultados e interpretación	15
Control de calidad	17
Datos específicos de funcionamiento	18
Limitaciones del procedimiento	20
Guía de solución de problemas	21
Referencias	24
Aviso al comprador	26

Uso

El kit Adellgene Huntington Disease CAG (HD) es un kit de diagnóstico in vitro diseñado para su uso en laboratorios. El kit detecta el número de repeticiones del triplete CAG (citosina-adenina-guanina) presentes en el exón 1 del gen IT15 (HTT), que puede desembocar en la aparición de la enfermedad de Huntington, también conocida como Corea de Huntington. El propósito de este kit es ayudar en el diagnóstico clínico asociado con la enfermedad, que se manifiesta con síntomas como ligeros cambios en la coordinación, movimientos menores involuntarios, planificación mental dificultosa y, a menudo, estado de ánimo deprimido o irritable.

Este kit permite la identificación tanto de individuos sanos como enfermos, que presentan, respectivamente, entre 10 y 35 repeticiones o más de 36 repeticiones [1, 2]. Existe una diferencia en la penetrancia entre individuos con 36 repeticiones y con más de 42 [2] (ver sección 2).

La tecnología está basada en la amplificación de DNA genómico mediante la TP-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de tripletes cebados), seguida de un análisis fluorescente del tamaño de los fragmentos de PCR obtenidos por un analizador genético y la conversión de dicho tamaño en el número de repeticiones de CAG.

Los alelos heterocigotos y los posibles homocigotos con un tamaño igual o inferior a 121 repeticiones CAG son cuantificados. La posible presencia de alelos mayores de este tamaño pueden ser identificados por su patrón.

Información general

La enfermedad de Huntington (HD, de las siglas en inglés Huntington Disease) es un trastorno progresivo que discurre con alteraciones motoras, cognitivas y psiquiátricas. La edad media de aparición es entre los 35 y los 44 años, la cual puede variar en función de la longitud de las repeticiones, de influencias epigenéticas y, posiblemente, de influencias ambientales. El tiempo medio de supervivencia es de 15 a 18 años después de su aparición. La corea, una alteración del movimiento involuntario consistente en sacudidas no repetitivas y no periódicas de las extremidades, cara o tronco, es el síntoma más grave de la enfermedad. Esta enfermedad aparece en 3-7 individuos de cada 100.000, pertenecientes a poblaciones descendientes de Europa occidental. La enfermedad se hereda de forma autosómica dominante, y está causada por la expansión de las repeticiones del trinucleótido CAG en el exón 1 de un gen denominado Huntingtin (HTT, originariamente conocido como IT-15), localizado en el cromosoma 4p16.3 [3]. Este trinucleótido codifica el aminoácido glutamina. El fragmento amino-terminal de la huntingtina mutada se localiza en las inclusiones intranucleares neuronales tóxicas y causa neuritis distrófica en la corteza y el cuerpo estriado de los individuos HD [4]. La acumulación de Huntingtin dentro de estas estructuras está influenciado por la longitud de la poliglutamina.

El gen IT15 se expresa principalmente en las neuronas [5]. Huntingtin está involucrado en procesos que contrarrestan las rutas apoptóticas normales [6]. La enfermedad de Huntington está considerada como un trastorno de apoptosis inapropiada que implica la muerte selectiva (localizada) de células neuronales, lo que puede desencadenar la neurodegeneración característica de la HD [7]. Se desconoce cómo los tramos de poliglutamina creados por las expansiones repetidas facilitan la degeneración selectiva de las neuronas. Los homocigotos para HD parecen tener una edad de comienzo de la enfermedad similar a la de los heterocigotos, pero pueden presentar una progresión de la enfermedad más rápida.

Un alelo normal del gen IT15 contiene entre 10 y 26 repeticiones de CAG. Los individuos con 27-35 repeticiones caen dentro del rango intermedio, y sus descendientes presentan el riesgo de padecer HD. El rango anormal varía entre 36 y 121 repeticiones, los individuos en la parte baja de este rango pueden presentar síntomas de HD o no. Expansiones mayores de 60 provocan la aparición de la enfermedad en edad temprana, mientras que expansiones de entre 40 y 55 repeticiones inducen el comienzo de la enfermedad en edad adulta [8]. Un número de repeticiones entre 27 y 35 puede ser meióticamente inestable en la transmisión paterna. Se sabe que los hijos de hombres con repeticiones dentro de este rango heredan repeticiones de 40 o más, que ya están asociadas con la enfermedad [9].

Un número de repeticiones entre 36 y 39 también son raras y están asociadas con penetrancia reducida; algunos individuos con repeticiones dentro de este rango desarrollan HD y otros no [9]. Repeticiones de 40 o más están asociadas con la expresión de HD. Los individuos con un número de repeticiones dentro de este rango desarrollarán la enfermedad, asumiendo que no mueran por otras causas antes de su aparición.

La edad de aparición de la enfermedad está inversamente relacionada con la longitud de las repeticiones [10, 11]. Estos dos factores juntos explican el fenómeno de la anticipación [12], según el cual la edad de comienzo

de la enfermedad tiende a disminuir en generaciones sucesivas; de media, los hijos afectados desarrollarán la enfermedad 8 años antes que sus padres afectados. La manifestación clínica de la anticipación puede ser dramática; en ocasiones los hijos de portadores del gen HD desarrollarán la enfermedad antes que sus padres.

La correlación es más fuerte para números de repeticiones más altos (y edades bajas de aparición) y es mucho más débil para números de repeticiones bajos (y edades altas de aparición). Esto implica que, aunque la longitud de las repeticiones CAG es el determinante más importante en la edad de aparición de HD en individuos jóvenes, factores distintos de la longitud de repeticiones CAG contribuyen significativamente en la aparición de HD en individuos mayores [13, 14, 15].

El kit Adellgene Huntington Disease está optimizado para la detección y cuantificación de aproximadamente 121 repeticiones de CAG, indicado para determinar los individuos sanos (10-35 repeticiones) y pacientes (36-121 repeticiones). La técnica está basada en el análisis de fragmentos generados con primers fluorescentes, electroforesis capilar en un analizador genético, y la posterior lectura de la fluorescencia con un software apropiado para la detección y la interpretación.

En los casos en los que solo aparece un pico y cualquier error inherente al proceso (baja cantidad de DNA, mala extracción de DNA, fallo en la reacción de PCR, etc) se ha descartado, es necesario observar el patrón de picos para confirmar la homocigosidad de la muestra. Este kit resuelve los casos de posibles individuos homocigotos basándose en el patrón del electroferograma resultante de la TP-PCR, con los productos de PCR de longitud completa. Estos picos aparecen separados 3pb, y tienen forma de una sierra de picos decreciente. Este perfil de picos proporciona la confirmación sobre la homocigosidad de una muestra o por el contrario de la presencia de un alelo expandido.

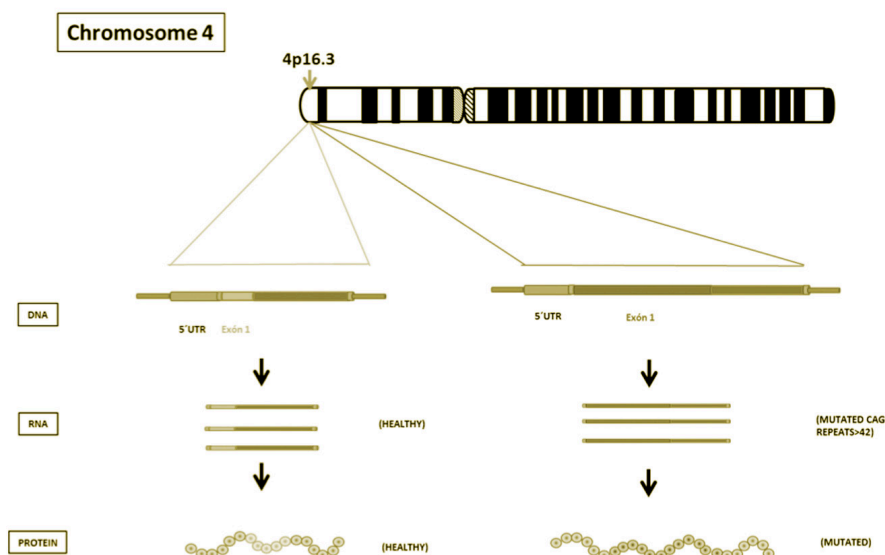


Figura 1. Representación de los diferentes tipos de gen HD y sus productos dependiendo del grado de mutación.

Principios del procedimiento

El método de detección empleado por Adellgene Huntington Disease CAG está basado en la amplificación específica de DNA genómico, concretamente del exón 1 del gen IT15 (HTT), que es donde aparecen las repeticiones de CAG. El kit incluye varios primers, uno de los cuales está marcado con un fluoróforo para su posterior detección en un analizador de fragmentos de DNA. Se recomienda el uso del marcador de peso molecular LIZ500™. El tamaño de los productos de PCR se convierte en número de repeticiones de tripletes CAG utilizando factores de conversión de tamaño y movilidad.

Contenido del kit

Referencia AD- HD-16 (16 tests)

- AD-HD-PM2: Primer mix (PM). 1 vial x 46 µL
- AD-HD-POM2: Polymerase Mix (POM). 1 vial x 390 µL

Almacenamiento del kit

- Todos los reactivos del kit deben ser almacenados entre -18°C y -30°C y son estables a esta temperatura hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.
- Dejar que los reactivos (excepto AD-HD-POM2) alcancen la temperatura ambiente antes de su uso. Agitar bien todos los reactivos excepto (excepto AD-HD-POM2) después de la descongelación.
- Antes de abrir los tubos de los reactivos, realizar una centrifugación breve de cada componente para que el reactivo se deposite en el fondo del tubo y no se pierda nada por las paredes.
- El test debe realizarse manteniendo los reactivos en hielo o sobre soporte frío.
- No realizar más de 3 ciclos de congelación/descongelación a los viales de Primer Mix (AD-HD-PM2) y Polymerase mix (AD-HD-POM2), ya que esto podría reducir la sensibilidad del ensayo y alterar los resultados.
- Debido a la naturaleza fotosensible del reactivo AD-HD-PM2, evitar su exposición continuada a la luz.

Materiales requeridos pero no suministrados

Reactivos de Extracción de DNA

- Los reactivos para la extracción del DNA de la sangre no están incluidos. El DNA puede ser extraído mediante cualquier método validado en el laboratorio que asegure una alta calidad y DNA intacto.

Reactivos para la electroforesis capilar (recomendados)

- Analizador Genético para polímero POP-7 (ABI: 3130, 3730 or 3500).
- Polímero POP-7 (ABI, Ref: 4363785 o equivalente).
- Formamida altamente desionizada (Hi-Di Formamide; ABI, Ref.: 4311320 o equivalente)
- Calibradores para los fluoróforos FAM y LIZ (ABI, Ref.: 4345833 or equivalent)
- Marcador de tamaño estándar LIZ 500™ (ABI, Ref.: 4322682)

Equipos

- Equipamiento general de laboratorio dedicado exclusivamente a realizar la PCR
- Termociclador (ABI, 9700, Veriti o equivalente)
- Centrífuga para placas de 96 pocillos
- Agitador (Vórtex)
- Microcentrífuga
- Micropipetas (P1000, P200, P20 y P2) y puntas con filtro específicas para ellas
- Placas de PCR de 96 pocillos (opcionales)
- Sellador de placas PCR (opcional)

Control Positivo

- El estándar WHO recomendado para la Enfermedad de Huntington o cualquier línea celular cuyo DNA se corresponda con una muestra validada.

Recolección y preparación de muestras

- Todas las muestras biológicas y de sangre deben tratarse como potencialmente infecciosas. Al manipularlas, observe las precauciones básicas o "universales". Cualquier manipulación de las muestras debe efectuarse con la apropiada protección personal, como gafas, guantes y ropa adecuada.
- Este test únicamente puede ser utilizado con muestras de sangre completa recogidas en tubos con los agentes anticoagulantes EDTA o ACD. La heparina puede interferir con la PCR y no debe utilizarse en este procedimiento. No deben utilizarse muestras de sangre hiperlipémicas, hemolizadas, ictericas o con proteinemia.
- La contaminación con DNAsas puede producir degradación del DNA, por lo tanto deben utilizarse puntas con filtro y tubos libres de DNAsas. Toda manipulación, pipeteado y uso de equipos debe realizarse con el máximo cuidado para evitar el fallo de la PCR.
- No mezclar componentes de distintos lotes. No utilizar los reactivos más allá de su fecha de caducidad.
- Antes de utilizar el kit, asegurarse de que el equipo (termociclador, analizador genético) ha sido calibrado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- El EtBr es potencialmente carcinogénico, evitar la inhalación de vapores y usar los medios adecuados para la manipulación y eliminación de desechos (ventilación, campana de extracción de humos, etc.).

i Precaución

Las propiedades toxicológicas del kit no han sido estudiadas en profundidad, por lo que se recomienda evitar el contacto con la piel y membranas mucosas. No ingerir. Existen Fichas de Datos de Seguridad (MSDS) a disposición del consumidor.

Procedimiento de uso

A. Extracción del DNA

La extracción del DNA a partir de muestras de sangre total recogidas con EDTA utilizando métodos estándar es compatible con el uso de este kit. Se recomienda realizar la evaluación de la cantidad y calidad del DNA obtenido mediante medidas de absorbancia a 260 nm (OD260; concentración) y de la relación entre las medidas de absorbancia a 260 y 280 nm (A260/A280, OD; pureza). El DNA obtenido puede ser almacenado a -20°C hasta su utilización. La cantidad adecuada de DNA para cada reacción de PCR es de aproximadamente 100ng (p.e. 1 µl de DNA de concentración 100ng/µl o 2 µl de DNA de 50ng/µl).

B. Preparación de la PCR y condiciones

i Precauciones

- Descongelar todos los componentes del kit antes de comenzar el ensayo, mezclar y centrifugar.
- Trabajar sobre hielo o en un bloque frío.
- La PCR se debe montar en la zona pre-PCR, con todas las precauciones mencionadas anteriormente.
- Utilizar sólo puntas con filtro y tubos de 1,5 mL autoclavados.
- Utilizar siempre guantes y bata.

1. 1. Preparación de la mezcla de Primer Mix y Taq Polymerasa para n+2 muestras:

Reactivo	Vol. para cada muestra (µL)
AD-HD-PM2	2.5
AD-HD-POM2	21.2
Volumen total para cada reacción	23.7

HUNTINGTON DISEASE

- Agitar la muestra con cuidado entre 3- 5 veces antes de distribuirla en los tubos de PCR para asegurar su completa homogeneización.
- Realizar un pulso de centrifugación para asegurar que no quedan burbujas ni muestra en las paredes.

Nota: Un exceso de AD-HD-PM2 podría inhibir la reacción de PCR

2. Pipetear 23.7 µl de esta mezcla en una placa o tubo de PCR estéril, y añadir el volumen de DNA, o de control negativo en el caso del pocillo de control de contaminación, necesario para alcanzar 100ng (p.e. 1 µl de DNA a 100ng/µl). En el caso de concentración de DNA baja, se podría añadir un volumen mayor de DNA independientemente del aumento del volumen total de la reacción de PCR. Sin embargo, hay que tener siempre en cuenta que **CONCENTRACIONES DE DNA MENORES O MAYORES DISMINUYEN CONSIDERABLEMENTE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS**,

3. Sellar las placas o los tubos con las cubiertas adecuadas y realizar un pulso de centrifugación para asegurar la mezcla y que no haya burbujas.

4. Colocar la placa o los tubos en el termociclador y llevar a cabo la reacción de PCR con las siguientes condiciones:

	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (mm:ss)
DESNATURALIZACIÓN	1	98	05:00
		97	00:35
CICLOS	10	62	00:35
		68	04:00
		97	00:35
CICLOS	25	64	00:35
		68	06:00
EXTENSIÓN FINAL	1	72	10:00
ENFRIAMIENTO	1	4	∞

C. Confirmación de productos de amplificación

La confirmación de que la amplificación se ha realizado de manera adecuada se puede realizar con un sistema apropiado como la electroforesis en geles de agarosa. Preparar un gel de agarosa a una concentración de 1-1.2% p/v validado según el protocolo del laboratorio y analizar 2 µL de cada amplificado para certificar que la PCR ha salido bien.

D. Preparación de las muestras para la electroforesis capilar

1. Preparación de muestras para el analizador de DNA

- La siguiente mezcla de reacción debe añadirse al producto de la PCR. Se recomienda diluir el producto de la PCR a 1/2 o 1/4 para el analizador 3730xl con agua destilada, para mejorar los resultados o para verificar la dilución óptima a cargar en el analizador de DNA.:

Reactivo	Vol. para cada muestra (µL)
Producto de la PCR*	1
Formamida altamente desionizada**	10
Marcador LIZ 500™ **	0.3
Volumen total para cada reacción	11.3

* No diluir para el 3130/3130xl. Diluir 1/2 o 1/4 para el 3730xl.

** Estos productos no se suministran con el kit

- Realizar un pulso de centrifugación (3-5 veces) para asegurar la mezcla de los reactivos y transferir 11 µl de la misma a la placa correspondiente para la electroforesis capilar.
- Sellar la placa, agitar y centrifugar para retirar las burbujas e introducir en el termociclador.
- Calentar la mezcla a 95°C durante 2 minutos para desnaturalizar el DNA y colocar en hielo, protegiendo la placa de la luz hasta la inyección en el secuenciador. Se recomienda usar un control positivo, en el que el número de repeticiones sea conocido (ver sección 6).

HUNTINGTON DISEASE

3. Módulo del analizador de DNA

Se recomiendan los siguientes módulos de trabajo para los distintos analizadores genéticos:

PARAMETROS	ANALIZADORES DNA	
	3130/3130xl	3730xl
Oven Temperature	60 °C	63 °C
Poly Fill Vol.	7300 steps	6500 steps
Current Stability	5.0 µAmps	5.0 µAmps
Pre-Run Voltage	15.0 KVolts	15.0 KVolts
Pre-Run Time	180 sec	180 sec
Injection voltage	3.0 KVolts	1.6 KVolts
Injection time	15 sec	30 sec
Voltage Number of steps	20 nK	20 nK
Voltage Step Interval	15 sec	15 sec
Data Delay Time	60 sec	60 sec
Run voltage	15.0 kVolts	15.0 kVolts
Run time	3000 sec	2200 sec

NOTA: En ambos casos se recomienda el uso del polímero POP7 y capilar de 36 cm.

Resultados e interpretación

Adellgene Huntington Disease es una técnica con un componente cuantitativo y otro cualitativo. El componente cuantitativo hace referencia a la habilidad de cuantificar el número de repeticiones del triplete CAG, entre 10 y al menos 121 (ver apartado Información General). El componente cualitativo necesita de la observación del patrón de la sierra de picos obtenido. La forma de este grupo de picos determina la presencia de alelos cortos o expandidos.

Utilizando los reactivos suministrados en este kit, si la muestra tiene 30 repeticiones CAG, el tamaño del fragmento amplificado será de 150 bases (Tabla 1). Todos los demás tamaños que se obtengan con el kit pueden ser tabulados basándose en esta relación. La introducción de un marcador de peso molecular permite al software del secuenciador proporcionar el tamaño del amplificado directamente, y por consiguiente, el número de tripletes CAG. No es necesario utilizar referencia pasiva. Las Figuras 2, 3 y 4 son gráficas del análisis de fragmentos de los resultados de individuos sanos y enfermos, analizados utilizando este kit.

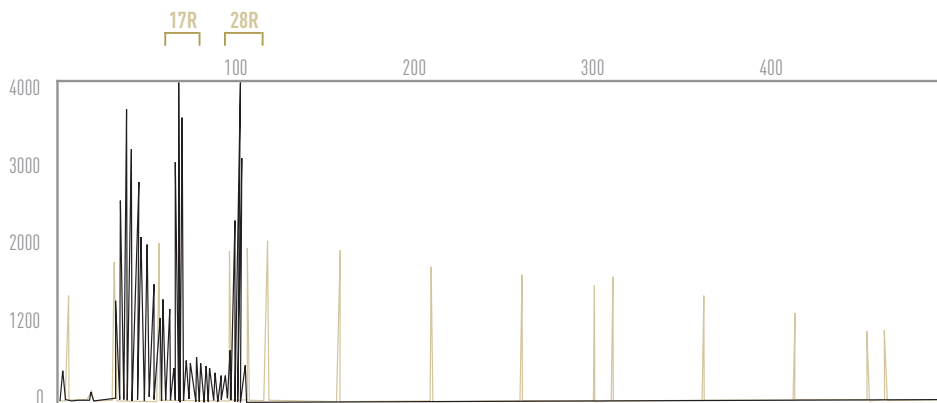


Figura 2. Individuo sano heterocigoto (17/28 repeticiones CAG).

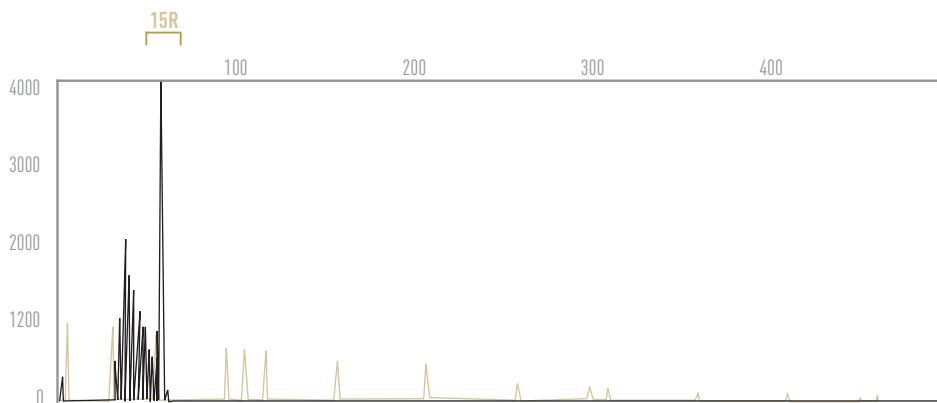


Figura 3. Individuo sano homocigoto (15/15 repeticiones CAG).

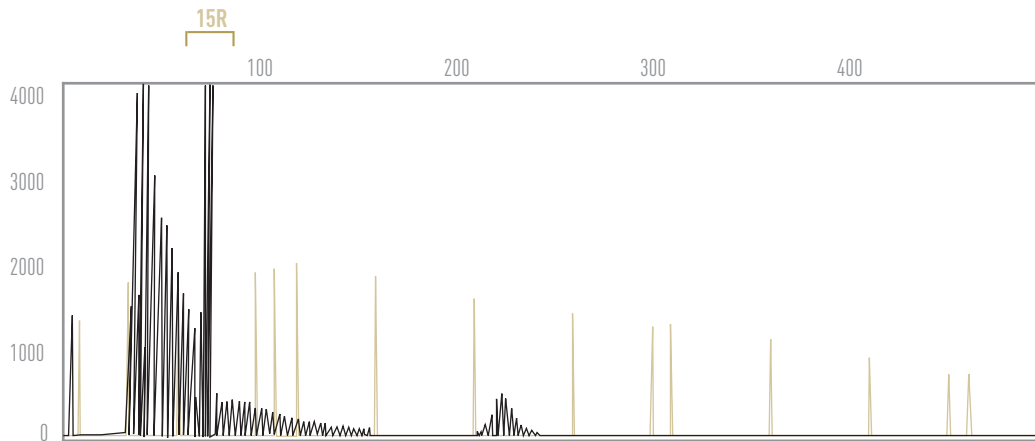


Figura 4. Individuo enfermo (19/65 repeticiones CAG).

Repeticiones CAG	Tamaño del fragmento (pb)	Repeticiones CAG	Tamaño del fragmento (pb)
10	90	65	255
15	105	70	270
20	120	75	285
25	135	80	300
30	150	85	315
35	165	90	330
40	180	95	345
45	195	100	360
50	210	110	375
55	225	115	390
60	240	120	405

Tabla 1. Correlación entre el tamaño de los fragmentos y el número de repeticiones CAG

Control de calidad

Debido a la naturaleza cuantitativa de este test, es necesario realizar una calibración de los fluoróforos FAM y LIZ en el secuenciador.

Además, como se describe en el procedimiento, se requiere el uso del marcador LIZ™ 500 como estándar, para la determinación del tamaño de los fragmentos de DNA.

Se recomienda llevar a cabo un control de contaminación sustituyendo la muestra de DNA por un control negativo (agua), así como un control positivo de tamaño conocido (ver sección 6).

El usuario debe tener en consideración todas las precauciones nombradas en el apartado 7 y las limitaciones de este procedimiento referidas en el apartado 12.

El ensayo se debe llevar a cabo según las recomendaciones del kit, así como según otros procedimientos de control de calidad que cumplan las especificaciones locales, estatales, federales y/o de las agencias certificadoras.

El kit ha sido testado en los analizadores de DNA 3130/3130xl y 3730xl DNA.

Datos específicos de funcionamiento

1. Especificidad y sensibilidad analítica

Los primers de este kit son específicos para el gen de la Enfermedad de Huntington (HTT, originally known as IT-15) (NC_000004.11) y comprenden la región de repeticiones CAG dentro del exón 1 del gen (NT_006051.18). La amplificación específica de esta región se verificó por secuenciación del DNA y analizando muestras de individuos sanos y de pacientes bien caracterizados. No se han reportado casos de reactividad cruzada con ningún otro gen del DNA genómico.

2. Especificidad diagnóstica

Adellgene Huntington Disease proporciona un análisis específico del exón 1 del gen HTT, que detecta el número de repeticiones CAG. También determina la presencia de un alelo expandido a través de la forma del patrón de picos obtenido.

Es posible la existencia de mutaciones (mutaciones puntuales, inserciones, deleciones) en los lugares de hibridación de los primers de amplificación, que puede resultar en la ausencia de determinación del alelo mutado. Podría ser necesario el uso de otras tecnologías para resolver este problema. Los resultados homocigotos deben confirmarse por procedimientos alternativos.

3. Rangos

- Concentración de DNA

Para conocer el rango óptimo de DNA en la reacción, se llevaron a cabo pruebas con la muestra de una mujer heterocigota entre 10 y 200 ng. Se determinó que el rango de trabajo recomendado es de aproximadamente 100ng de DNA por PCR.

- Resultados del kit

Este kit puede asignar un número de repeticiones de tripletes CAG entre 10 y 121. Este kit está indicado para la determinación tanto de individuos sanos, con 10-35 repeticiones, como de individuos enfermos, con 36 repeticiones o más, con una diferencia en la penetrancia entre 36 y más de 42 repeticiones (ver sección 1).

4. Precisión

- Asignación del tamaño del fragmento.

La asignación de los picos viene dada por el tamaño del amplicón obtenido y la morfología del pico. Si hay varios picos, se considerará el más alto y que se encuentre en la parte central. La precisión en el número de repeticiones fue determinada comparando muestras secuenciadas con los tamaños obtenidos con el presente kit. Se determinaron unas variabilidades de número de repeticiones con un error aceptable de ± 1 repeticiones para alelos menores o iguales que 42, y de ± 3 repeticiones para alelos de más de 42.

- Análisis general

Región Exón 1/HTT	Muestras analizadas
Número de muestras heterocigotas sanas	25
Número de muestras homocigotas sanas	3
Número de muestras con alelo expandido	34
Número de muestras analizadas	62

- Interferencias

Diversas sustancias que pueden estar presentes en la sangre periférica podrían, potencialmente, interferir con la metodología de PCR; en la literatura se ha descrito la inhibición de la actividad de la polimerasa. Por lo tanto, es necesario que el DNA obtenido tenga la pureza necesaria para evitar interferencias. Los métodos de extracción de DNA estandarizados eliminan esas sustancias; por lo tanto se recomienda que el método de extracción de DNA usado en el laboratorio esté validado.

Limitaciones del procedimiento

- El método detecta todos los alelos entre 10 y al menos 121 repeticiones del triplete CAG (ver sección 9).
- Las condiciones descritas para la PCR deben controlarse cuidadosamente. Desviaciones de los parámetros establecidos pueden derivar en resultados deficientes.
- Todos los trabajos realizados con el kit Adellgene Huntington Disease deben realizarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio y en cumplimiento con regulaciones locales, como estándares internacionales.
- El termociclador debe ser calibrado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y utilizarse dentro de los límites establecidos.
- El analizador de DNA debe ser calibrado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para los fluoróforos mencionados, y utilizarse dentro de los límites establecidos.
- No mezclar componentes de diferentes kits o lotes.
- No utilizar el kit después de su fecha de caducidad.
- No utilizar el kit si se sospecha que puede sufrir falta de reactividad, contaminación deterioro del envase o cualquier otro incidente que pueda afectar a su funcionamiento.
- La interpretación de los datos y los resultados del genotipado deben ser revisados por personal cualificado.
- Eliminar los reactivos caducados siguiendo las regulaciones aplicables.

Guía de solución de problemas

El control negativo de la PCR resulta positivo

- **Contaminación de la Primer mix o de la Polymerase Mix o del agua del CN**
 - Repetir el experimento con alícuotas nuevas del Primer Mix/ Polymerase Mix/ agua
 - Manipular los componentes del kit proporcionado según las prácticas comúnmente aceptadas para evitar contaminación.
 - Comprobar el almacenamiento y las condiciones de manipulación.
 - Desechar los reactivos contaminados.
- **Contaminación en el área pre-PCR**
 - Confirmar que se han seguido las precauciones necesarias en el área pre-PCR.
 - Comprobar posibles problemas de contaminación en otras técnicas de PCR.
 - Confirmar la idoneidad de los fungibles utilizados (tubos, puntas de pipeta).
- **Error de pipeteo**
 - Verificar que la muestra añadida corresponde con la asignada en la hoja de trabajo.

Señal débil o inexistente del producto de PCR

- **Calidad baja de la muestra de DNA**
 - Repetir la extracción de DNA
- **Muestra con muy baja concentración de DNA**
 - Comprobar la concentración de DNA
- **Muestra con elevada concentración de DNA**
 - Hacer una evaluación del sistema de extracción testando varias diluciones de la muestra
- **Presencia de inhibidores de la PCR en el DNA genómico**
 - Evitar el uso de sangre total que contenga heparina. Volver a extraer el DNA y repetirá la PCR si es posible.

- **DNA polimerasa añadida en cantidad insuficiente, o mezclado deficiente de los componentes de la PCR**
 - Repetir la PCR asegurándose de que todos los componentes se han mezclado y añadido en la cantidad adecuada.
- **Problemas en el termociclador**
 - Comprobar los parámetros del programa de termociclado y asegurarse de que el termociclador funciona de acuerdo a las especificaciones y mantenimiento establecidos por el fabricante
- **No se ha añadido bromuro de etidio (u otro reactivo de tinción de DNA)**
 - Asegurarse de añadir el reactivo de tinción del DNA en el gel o en el buffer de electroforesis

Tamaño de la banda incorrecto, o número de bandas incorrecto

- **Uso del kit incorrecto**
 - Comprobar que se ha utilizado el kit correcto
- **Uso de un programa de termociclado incorrecto**
 - Comprobar los parámetros del termociclador
- **Contaminación de la PCR**
 - Comprobar el control negativo de la tanda. Llevar a cabo protocolos de descontaminación y repetir la PCR para identificar el origen de la contaminación.

Electroferogramas con señal débil

- **Degradación del kit**
 - Confirmar el adecuado almacenamiento del kit
 - Evitar más de 3 ciclos de congelación/descongelación de los reactivos
 - Realizar alícuotas de los reactivos si es necesario.
 - Repetir con un lote fresco de reactivos
- **La taq polimerasa ha perdido actividad**
 - Confirmar la actividad de la Polymerase Mix
 - Repetir con un vial nuevo de Polymerase Mix

HUNTINGTON DISEASE

- **Producto de PCR débil**
 - Comprobar la imagen del gel y proceder en consecuencia
 - Insuficiente cantidad de producto de PCR inyectado en el analizador de DNA Comprobar los parámetros del analizador genético
- **Proceso de purificación incorrecto**
 - Extremar el cuidado en el proceso de purificación

Alta intensidad de fluorescencia

- **Demasiado producto de PCR**
 - Comprobar la imagen del gel. Diluir el producto de PCR.
- **Demasiado producto de PCR inyectado en el analizador genético**
 - Comprobar los parámetros del instrumento.
- **Error de pipeteo**
 - Verificar que el volumen añadido en cada pocillo coincide con el correcto.

Elevada señal de fondo (ruido en la línea de base)

- **Producto de PCR contaminado**
 - Ver más arriba
- **Purificación del producto de PCR deficiente**
 - Asegurar que se ha realizado la purificación de acuerdo con las instrucciones indicadas

Referencias

1. Rubinsztein DC, Leggo J, Coles R, Almqvist E, Biancalana V, Cassiman JJ et al. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease gene (HD) reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats *Am J of Hum Genet* 59: 16-22, 1996.
2. Brinkman RR, Mezei MM, Theilman J, Almqvist E, Hayden MR. The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age for a specific CAG size. *Am J Hum Genet* 60: 1202-1201, 1997.
3. Margolis RL, Ross CA. Diagnosis of Huntington Disease. *Clinical Chemistry* 49:1726-1732, 2003.
4. DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., & Aronin, N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neuritis in brain. *Science* 277: 1990-1993, 1997.
5. Dure, L. S., IV, Landwehrmeyer, G. B., Golden, J., McNeil, S. M., Ge, P., Aizawa, H., Huang, Q., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Bird, E. D., DiFiglia, M., Gusella, J. F., MacDonald, M. E., Penney, J. B., Young, A. B., & Vonsattel, J.-P.. IT15 gene expression in fetal human brain. *Brain Research*, 659, 33-41, 1994.
6. Zeitlin, S., Liu, J.-P., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E., & Efstratiadis, A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature Genetics*, 11, 155-163, 1995.
7. Portera-Cailliau, C., Hedreen, J. C., Price, D. L., & Koliatsos, V. E. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *Journal of Neuroscience*, 15, 3775-3787, 1995.
8. Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., & Hayden, M. R. Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. *Human Molecular Genetics*, 6, 2005-2010, 1997.
9. Myers RH. Huntington's disease genetics. *NeuroRx*. 1: 255-62, 2004.
10. Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* 4:387-92, 1993.
11. Stine OC, Pleasant N, Franz ML, Abbott MH, Folstein SE, Ross CA. Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Hum Mol Genet* 2:1547-9, 1993.
12. McInnis MG. Anticipation: an old idea in new genes. *Am J Hum Genet* 59:973-9, 1996.

HUNTINGTON DISEASE

13. Kremer B, Squitieri F, Andrew SE, Theilmann J, Spence N, Goldberg YP, Hayden MR. Molecular analysis of late onset Huntington's disease. *J Med Genet* 30:991-995, 1993.
14. Stine OC, Pleasant N, Franz ML, Abbott MH, Folstein SE, Ross CA Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Hum Mol Genet* 2:1547-1549, 1993.
15. Telenius H, Kremer HPH, Theilmann J, Andres SE, Almqvist E, Anvret M, Greenberg C, et al. Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG) repeat length is the sex of the affected parent. *Hum Mol Genet* 2:1535-1540, 1993.

Aviso al comprador

- Este producto está concebido para uso en diagnóstico in vitro.
- Los productos de BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U. no deben ser revendidos, modificados para reventa ni utilizados para fabricar otros productos comerciales sin autorización de BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U.
- La información del presente documento puede ser modificada sin previo aviso. BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U. no asume ninguna responsabilidad por los errores que puedan encontrarse en este documento. Este documento se considera completo y exacto en el momento de su publicación. En ningún caso será BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U. responsable por daños fortuitos, especiales, múltiples o derivados del uso de este documento.
- La compra de este producto concede derechos al comprador bajo ciertas patentes de Roche, utilizándose sólo para proporcionar servicios de diagnóstico in vitro. La compra no concede ninguna patente general ni otra licencia de ningún tipo aparte de este derecho de uso específico por la compra.
- FAM™ y LIZ™ son marcas comerciales de Life Technologies Corporation.
- LIZ™ and FAM™ podrían estar cubiertas por una o más de las patentes propiedad de Applied Biosystems, LLC. El precio de compra de este producto incluye derechos limitados, no transferibles.
- ADELLGENE es una marca comercial de BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U.