

adellgene

Myotonic Dystrophy Screening

INSTRUCCIONES DE USO

Rv. 04 / 27-05-2019

Kit para la determinación mediante análisis de fragmentos fluorescentes de la presencia de alelos sanos, premutados y mutados con menos de 200 repeticiones del gen DMPK de la Distrofia Miotónica tipo 1.

CE

Referencia AD-MD-16

Almacenar: Box 1 de -30°C a -18°C

Box 2 de 20°C a 25°C



BDR

BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES

Index

Uso	3
Resumen y explicación	4
Principios del procedimiento	7
Contenido del kit	8
Almacenamiento del kit	9
Materiales requeridos pero no suministrados	10
Recolección y preparación de muestras	11
Procedimiento de uso	12
Resultados e interpretación	17
Control de calidad	20
Datos específicos de funcionamiento	21
Limitaciones del procedimiento	23
Guía de solución de problemas	24
Referencias	27
Aviso al comprador	29

Uso

El kit Adellgene® Myotonic Dystrophy Screening es un kit de diagnóstico in vitro diseñado para su uso en laboratorios de diagnóstico que detecta el número de repeticiones del triplete CTG en la región 3' no traducida del gen DMPK localizado en el cromosoma 19 dando lugar a la Distrofia Miotónica Tipo 1 (DM1) que va desde síntoma no apreciables o leves a severos.

El uso de este kit es la determinación de los individuos sanos que tienen entre 35 y 49 repeticiones del triplete CTG, los pacientes con fenotipo leve (50-150 repeticiones) y con fenotipo clásico (100-1000) hasta 200 repeticiones. La tecnología se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: polymerase chain reaction) de DNA genómico extraído y purificado a partir de sangre periférica seguido por el análisis de fluorescencia del tamaño de los fragmentos de PCR obtenidos por el analizador genético y la conversión de ese tamaño en el número de repeticiones CTG.

El Primer Mix Screening (PM1) junto con la mezcla de la polimerasa (POM) permite la detección de heterocigotos y alelos homocigotos posibles con un tamaño de menos de 200 repeticiones CTG, y su cuantificación.

En los casos de individuos homocigotos cuyo alelo detectado es inferior a 200 repeticiones o no se detecta ningún alelo debe hacerse un estudio posterior con el kit Adellgene® Myotonic Dystrophy Confirmatory para establecer la presencia de alelos de más de 200 repeticiones.

Resumen y explicación

La Distrofia Miotónica tipo 1 o enfermedad de Steinert es actualmente la forma más común de la Distrofia Muscular en adultos. Fue reconocida clínicamente por primera vez por Steinert (1) y Batten y Gibb (2) en 1909. Basada en la determinación clínica, se estima una prevalencia mundial de 12,5 / 100.000 (3), pero puede ser mayor ya que muchos pacientes en generaciones de más edad siguen sin diagnosticar. La herencia de esta enfermedad multisistémica es autosómica dominante, y la expresión fenotípica es muy variable debido a una expansión inestable de trinucleótidos CTG localizada en la región 3' no traducida (3'UTR) del gen de la proteína distrofia miotónica quinasa (DMPK, OMIM * 605377) (4 -6) situado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q.21.3). El gen DMPK expandido produce un transcrito de RNA tóxico que no puede salir del núcleo (7).

Los rangos de referencia para los tamaños de los alelos fueron establecidos por el Segundo Consorcio Internacional de la Distrofia Miotónica (IDMC) en 1999 (8-11) de las normas técnicas y las directrices para las pruebas. Alelos normales: 5-34 repeticiones CTG; Alelos normales mutables (premutación): 35-49 repeticiones CTG. Los individuos con expansiones CTG en el rango de premutación no se han notificado que tengan síntomas, pero sus hijos tienen un mayor riesgo de heredar un tamaño de repetición más grande y por lo tanto tener síntomas (12). Los alelos con penetrancia completa >50 repeticiones CTG se asocian a manifestaciones de la enfermedad.

Los hallazgos clínicos en la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) abarcan un continuo que va desde leve a grave (13) y proporcionan una excelente visión general de todos los aspectos de la DM1. Los hallazgos clínicos se han clasificado en tres fenotipos poco solapados, suave, clásico, y congénito, que por lo general se correlacionan con el tamaño de repetición CTG (Tabla 1) (8, 9, 14-17).

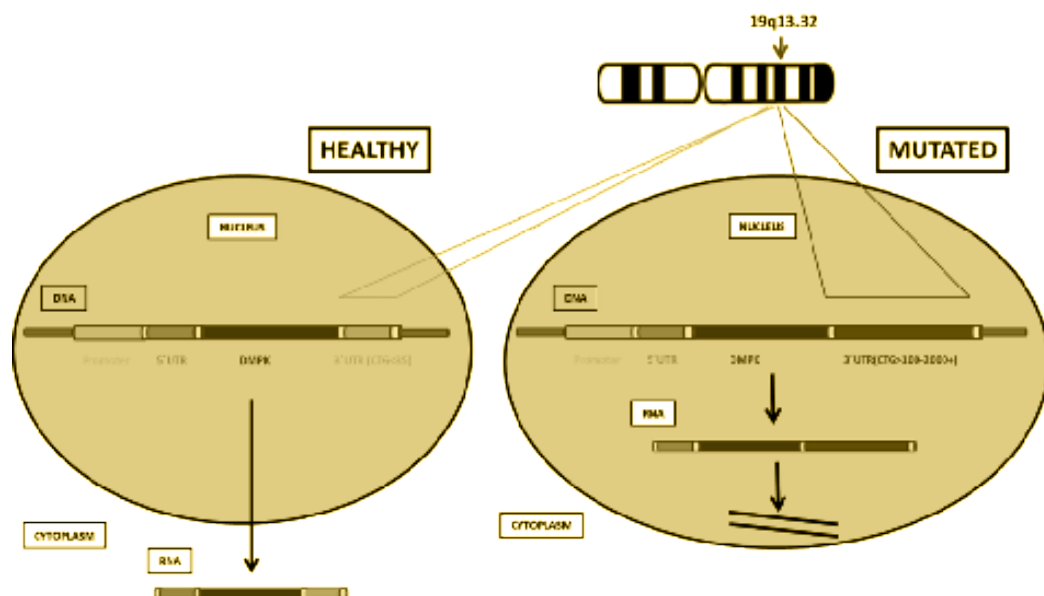


Figura 1. Representación de los tipos de gen DMPK y su producción dependiendo del grado de mutación.

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

La DM1 leve (50-150 CTG repeticiones) sólo puede tener cataratas, miotonía leve, o diabetes mellitus. Pueden tener una vida plenamente activa y una vida normal o mínimamente acortada (18).

Dentro del fenotipo clásico de DM1 (100-1000 CTG repeticiones), sólo existe una correlación aproximada con la gravedad de los síntomas. Las personas con estos tamaños de repetición CTG suelen desarrollar DM1 clásica con debilidad muscular y atrofia, miotonía, cataratas y trastornos en la frecuencia cardíaca. Mientras que la edad de inicio para el fenotipo clásico de la DM1 está típicamente en los años 20 y 30 (y con menos frecuencia después de los 40 años), el fenotipo clásico de DM1 puede ser evidente en la infancia, cuando se observan signos sutiles como facies miotónica y miotonía. En el caso del fenotipo congénito de DM1 (>1000 repeticiones

Fenotipo	Signos clínicos	Nº de repeticiones CTG	Edad de comienzo
Normal mutable (premutación)	No hay	35 a 49	No definido
Moderado o leve	Cataratas		
	Miotonia leve	50 a ~150	20 a 70 años
Clásico	Debilidad		
	Myotonia		
	Cataratas		
	Calvicie		
	Aritmias cardíacas		
	Otros	~100 a ~1000	10 a 30 años
Congénito	Hipotonía infantil		
	Déficit respiratorio		
	Incapacidad intelectual		
	Signos clásicos de adultos	>1000	0 a 10 años

Tabla 1. Correlación del fenotipo y el número de repeticiones CTG en la Distrofia Miotónica tipo 1

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

CTG), una distorsión en la transmisión del gen en la concepción, favorece la transmisión de mayor número de repeticiones CTG que las presentes en el ascendiente (19).

La presencia de un gran número de repeticiones puede conducir a la aparición de la enfermedad antes y con síntomas más graves, y se conoce como DM1 congénita (20, 21). La DM1 congénita se presenta a menudo antes de nacer con polihidramnios y la reducción de los movimientos fetales. Después del parto, las características principales son la debilidad severa generalizada, hipotonía y compromiso respiratorio. La mortalidad por insuficiencia respiratoria es común. Los bebés sobrevivientes experimentan una mejora gradual en la función motora. Los niños afectados suelen ser capaces de caminar; sin embargo, se produce una miopatía progresiva con el tiempo, como en la forma clásica (15). Estas personas pueden desarrollar cualquiera de las características típicas de la DM1 que incluyen debilidad, miotonía, cataratas y problemas cardíacos. La discapacidad intelectual está presente en el 50% -60% de las personas con DM1 congénita. Se han descrito como síntomas, autismo, trastornos de ansiedad, alteración de la atención, y habilidades visuales-espaciales anormales (22, 23). Los niños con DM1 pueden tener una baja agudeza visual, hipermetropía o astigmatismo (24).

Principios del procedimiento

El método de detección utilizado en el kit Adellgene® Myotonic Dystrophy Screening se basa en la amplificación específica de DNA genómico que contiene la región 3'UTR del gen DMPK, que contiene el triplete CTG. La PM1 incluye 2 primers, uno de los cuales está marcado con un fluoróforo para la detección subsiguiente en un analizador de fragmento de DNA. Se recomienda el uso del marcador de tamaño ROX1000™. El tamaño de los productos de PCR se convierten en el número de repeticiones de tripletes CTG utilizando factores de conversión basados en la movilidad y el tamaño.

Contenido del kit

Referencia AD-MD-16 (16 tests)

Box 1 de 2

- AD-MD-PM1: Primer Mix Screening (PM1). 1 vial x 79 µl
- AD-MD-POM: Polymerase Mix (POM). 1 vial x 344 µL

Box 2 de 2:

- AD-PUR-16: 1 unidad. Incluye reactivos y fungible para realizar la purificación de los amplicones de 16 muestras. Contiene:
 - Capture buffer: 9,8 mL
 - Wash buffer: 2,0 mL (ver cómo preparar en sección Procedimiento de uso / D)
 - Elution buffer: 300 µl
 - Micro - columns: 17 units
 - Collection tubes: 17 units

Almacenamiento del kit

- Todos los reactivos de la Caja 1 deben ser conservados entre -30°C y -18°C. Los reactivos de la Caja 2 deben ser almacenados entre 20 y 25°C. A estas temperaturas, son estables hasta la fecha de caducidad.
- Dejar que los reactivos (excepto AD-MD-POM) alcancen la temperatura ambiente antes de su uso. Agitar bien todos los reactivos excepto AD-MD-POM 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-MD-PM1) y Polymerase Mix (AD-MD-POM), ya que esto podría reducir la sensibilidad del ensayo y alterar los resultados. Es recomendable establecer alícuotas de estos reactivos, en el primer ciclo de descongelación, dependiendo del uso del kit.
- Debido a la naturaleza fotosensible del reactivo AD-MD-PM1, evitar su exposición continuada a la luz.

Materiales requeridos pero no suministrados

Reactivos de Extracción y Purificación

- 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.
- Etanol absoluto

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 ROX (ABI, Ref.:4345827, 4345829 o equivalentes)
- Marcador de tamaño estándar ROX 1000 (ABI, Ref.: 401098; Eurogentec, Ref.: MW-0195-80ROX)

Equipos

- Equipo 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 (P200, P20 y P2) y puntas con filtro específicas para ellas
- Placas/tubos de PCR, y dispositivo de cierre correspondiente
- Tubos de 1,5 ml libres de DNAsas para microcentrífuga (2 por purificación)

Control Positivo

- El estándar WHO recomendado para la Distrofia Miotónica 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.

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 de 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 de 50 ng (p.e.: 1 µl de DNA de concentración 50 ng/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. Preparación de la mezcla de Primer Mix y Polimerasa Mix para n+1 muestras::

Reactivos	Vol. por cada muestra (µL)
AD-MD-PM1	4,3
AD-MD-POM	18,7
Volumen total por cada reacción	23

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

- 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: El exceso de AD-MD-PM1 podría inhibir la reacción de PCR

2. Pipetear 23 µl de esta mezcla en una placa óptica o en un tubo estéril, y añadir el volumen de DNA necesario para llegar a 45-50 ng (p. e.: 1 µl de DNA de concentración 45-50 ng/µl) o control negativo en el caso del pocillo de control de contaminación. En el caso de que la muestra tenga una baja concentración de DNA, se debería añadir un volumen mayor independientemente del incremento del volumen final de la PCR.
3. Sellar las placas con las cubiertas (incluidas con las placas) o cerrar el tubo, y realizar un pulso de centrifugación para asegurar la mezcla y que no haya burbujas.
4. Colocar la placa en el termociclador y llevar a cabo la reacción de PCR.

	Numero de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (mm:ss)
DESNATURALIZACIÓN	1	98	05:00
		97	00:35
CICLOS	30	64	00:35
		68	04:00+ 00:20SEG/CY
EXTENSIÓN FINAL	1	72	30:00
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.

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

D. Preparación de las muestras para la electroforesis capilar

1. Purificación de la reacción de PCR

- Usar el Box 2 de 2 incluido con el kit. El protocolo es:

La primera vez que se haga uso de la Caja 2, es necesario añadir 8mL de etanol absoluto al vial Wash Buffer. Marcar la casilla correspondiente en la etiqueta de dicho vial para indicar que se ha realizado la adición.



- Añadir 500 µl de Capture buffer a la muestra (usar 17 µl de producto de PCR).
- Mezclar minuciosamente.
- Comprobar que la mezcla del Capture buffer y la muestra es de color amarillo o naranja pálido.
- Para cada purificación que se va a llevar a cabo, montar una micro-columna sobre un tubo de recolección.
- Centrifugar la mezcla de Capture buffer y muestra brevemente para recoger todo el líquido en el fondo del tubo.
- Cargar la mezcla agitada en la micro-columna que se encuentra sobre el tubo de recolección.
- Centrifugar la columna montada sobre el tubo de recolección a 16000 g durante 30 segundos.
- Descartar el líquido vaciando el tubo de recolección. Colocar la micro-columna de nuevo sobre el tubo de recolección.
- Añadir 500 µl de Wash buffer a la micro-columna.
- Centrifugar la columna montada sobre el tubo de recolección a 16000 g durante 30 segundos.
- Descartar el tubo de recolección y transferir la microcolumna a un microtubo de 1,5 ml libre de DNAsas nuevo.
- Añadir 10 µl de Elution buffer en el centro de la membrana de la microcolumna, acoplada al nuevo tubo de recolección de muestra.

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

- m. Incubar la columna y el tubo a temperature ambiente durante 1 minuto.
- n. Centrifugar la columna y el tubo de recolección de muestra a 16000 g durante 1 minuto para recoger en el fondo el DNA purificado.
- o. Continuar con el protocolo general del kit Myotonic Dystrophy Screening.

2. Preparación de muestras para el secuenciador de DNA

Se lleva a cabo la siguiente mezcla de reacción con el producto purificado de la PCR:

ReACTIVO	Vol. por cada muestra (µl)
Producto purificado de la PCR	2 **
Formamida altamente desionizada *	10
Marcador LIZ500™ *	0.3
Volumen total para cada reacción	12.3

* Estos productos no se suministran con el kit.

** Se recomienda el uso de un rango entre 1 y 3 µl de volumen de carga para optimizar los resultados

- Realizar una breve centrifugación para asegurar la mezcla de los reactivos y transferir 2 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.
- Desnaturalizar 2 minutos a 95°C 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 CTG sea conocido (ver sección 6).

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

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

En ambos casos se recomienda el uso del polímero POP7

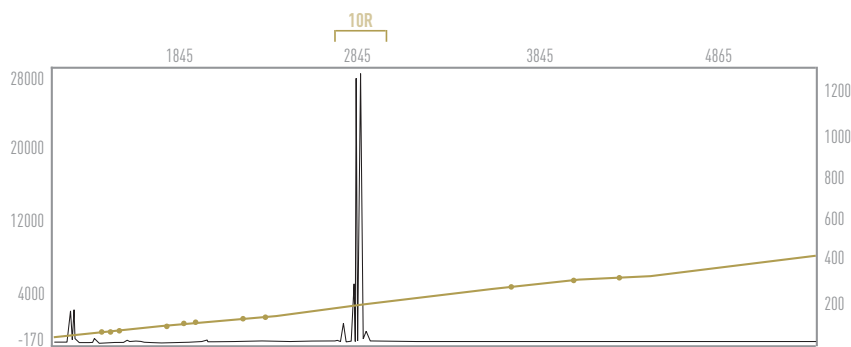
Resultados e interpretación

El kit Adellgene® Myotonic Dystrophy Screening es una técnica cuantitativa para identificar el número de tripletes CTG entre 5 y al menos 200 (véase la sección 2).

El kit Adellgene® Myotonic Dystrophy Screening incluye una serie de reactivos que proporcionan la amplificación de esta región y permiten determinar el número de repeticiones para establecer los individuos sanos y enfermos. Por otra parte, las muestras que dan sólo un pico tendrán que ir a un estudio posterior por el kit de Adellgene® Myotonic Dystrophy Confirmatory para asegurar o descartar la homocigosis de la muestra.

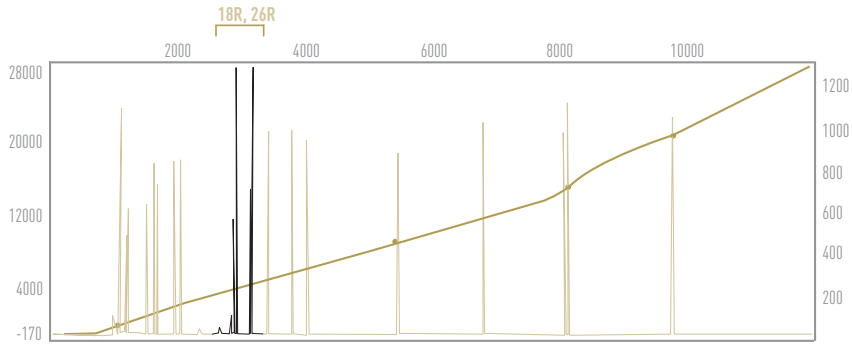
Utilizando los reactivos suministrados en este kit, si la muestra tiene una serie de 5 repeticiones CTG, el tamaño del fragmento amplificado será de 265 bases (Tabla 1). El número de repeticiones obtenido con este componente del kit puede ser tabulada basada en este tamaño. La introducción de un marcador de tamaño permite al software del analizador genético dar el tamaño del amplificado directamente y por lo tanto podemos obtener el número de repeticiones CTG. No es necesario el uso de ninguna referencia pasiva.

En la figura 2 se expresan los resultados del análisis de fragmentos (ver más abajo) del kit para un individuo homocigoto sano (muestra 1), individuo sano heterocigoto (muestra 2), y los individuos no sanos (muestras 3-5).

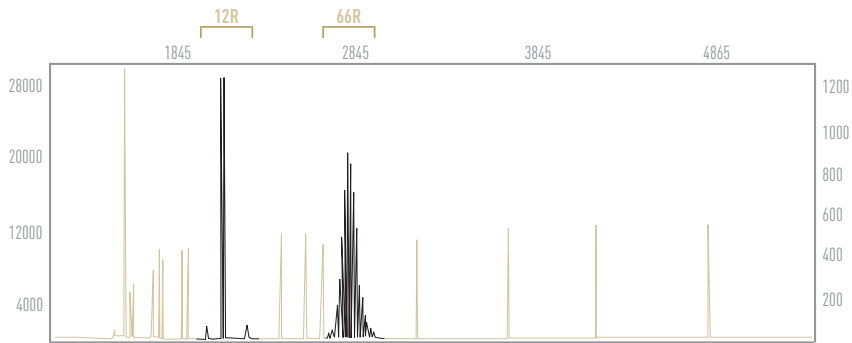


Muestra 1. Homocigoto 10,10 repeticiones (10R)

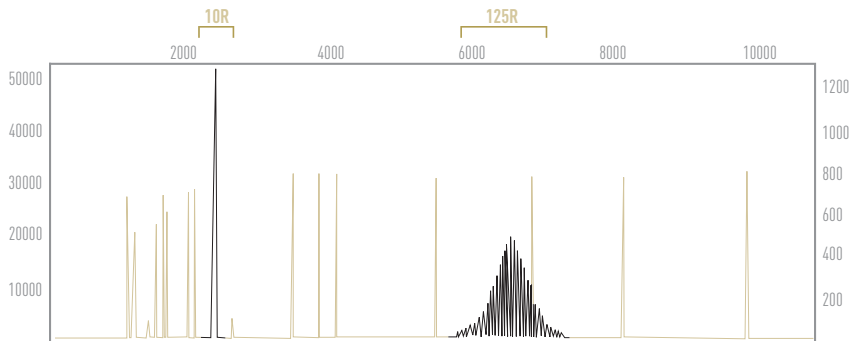
MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING



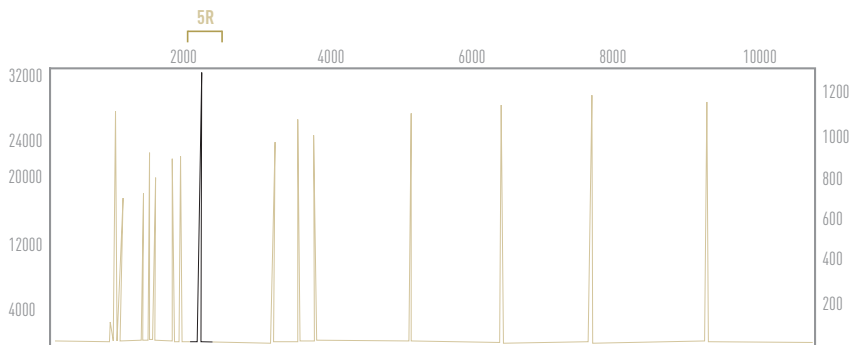
Muestra 2. Heterocigoto 18,26 repeticiones (18R,26R)



Muestra 3. Heterocigoto 12,66 repeticiones (12R,66R)



Muestra 4. Heterocigoto 5,125 repeticiones (5R,125R)



Ejemplo 5. Heterocigoto 5,>125 repeticiones (5R,>200R)

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

Repeticiones CTG	Tamaño del fragmento (bp)	Repeticiones CTG	Tamaño del fragmento (bp)
5	265	105	565
10	280	110	580
15	295	115	595
20	310	120	610
25	325	125	625
30	340	130	640
35	355	135	655
40	370	140	670
45	385	145	685
50	400	150	700
55	415	155	715
60	430	160	730
65	445	165	745
70	460	170	760
75	475	175	775
80	490	180	790
85	505	185	805
90	520	190	820
95	535	195	835
100	550	200	850

Los números negros indican alelos sanos. Los números dorados indican alelos premutados o mutados.

i Nota importante

Esta tabla se ha realizado a partir de los resultados obtenidos con el kit en un Analizador Genético 3730xl (Applied Biosystems) utilizando polímero POP7. Para un mejor ajuste del número de repeticiones, el laboratorio usuario debe incluir una muestra control con un número de repeticiones conocido en cada tanda de análisis para normalizar la movilidad de los picos en unas condiciones de electroforesis particulares (polímero, secuenciador, condiciones de electroforesis,...).

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 LIZ500™ 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, así como un control positivo de tamaño conocido (ver sección Materiales requeridos pero no suministrados).

El usuario debe tener en consideración todas las precauciones nombradas en el apartado Recolección y preparación de muestras y las limitaciones de este procedimiento referidas en el apartado Limitaciones del procedimiento.

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.

Datos específicos de funcionamiento

1. Especificidad y sensibilidad analítica

Los primers de este kit son específicos para el gen humano de la Distrofia Miotónica DMPK y comprenden la región de repetición CTG dentro del 3'UTR del gen. La amplificación específica de esta región fue verificada por secuenciación del DNA y por ensayo de muestras de individuos sanos y pacientes bien caracterizados. No hay ningún caso reportado de reactividad cruzada con otro gen a partir de DNA genómico.

2. Especificidad diagnóstica

Adellgene® Myotonic Dystrophy Screening es un ensayo específico para detectar el número de repeticiones CTG de la región 3'UTR del gen DMPK. Si sólo se encuentra un pico, es necesario el uso del kit Adellgene® Myotonic Dystrophy Confirmatory u otra técnica alternativa para confirmar la presencia o no de alelos mutados (>200 repeticiones CTG). Las mutaciones (mutaciones puntuales, inserciones, deleciones) en sitios de los primers de amplificación son posibles y pueden dar lugar a la falta de definición alelo. Otras tecnologías podrían ser necesarias para resolver los alelos. Resultados de homocigotos deben ser confirmadas por procedimientos alternativos.

3. Rangos

- Concentración de DNA

Para el estudio del rango óptimo de la cantidad de DNA utilizado en el ensayo, se realizaron pruebas utilizando de 10 ng a 200 ng con una muestra heterocigótica hembra. La asignación de los picos de tamaño obtenido fue independiente de la cantidad de DNA utilizado. El rango de DNA de trabajo recomendado es de entre 45 a 50 ng de DNA por PCR.

- Resultados del kit

El método de este kit puede asignar alelos con un número de repeticiones del triplete CTG de entre 5 y 200. El uso de este kit es la determinación de los individuos sanos (5-49 repeticiones) y los pacientes afectados con 50 repeticiones o más, con diferente penetrancia, hasta 200 (ver sección apartado Resumen y explicación).

4. Precisión

- Asignación del tamaño del fragmento.

La asignación de los picos está dada por el tamaño del amplicón obtenido y la morfología del pico. Si

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

hay varios picos, será considerado el más alto y el pico central. La precisión del número de las repeticiones se determinó comparando muestras secuenciadas con los tamaños obtenidos con el presente kit que comprende una variabilidad de No. de repeticiones ± 1 para los alelos sanos y ± 3 para 50-200 repeticiones alelos.

- Análisis general

Región 3'UTR/DMPK	Muestras analizadas
Número de muestras con 2 alelos normales (5-34 rep.)	17
Número de muestras con 1 alelo premutado (35-49 rep.)	1
Número de muestras con 1 alelo mutado (>50 rep.)	38
Total muestras analizadas	56

- Interferencias.

Se han descrito en la literatura, que existe un número de sustancias que pueden estar presentes en la sangre periférica y pueden interferir potencialmente con la metodología basada en PCR, inhibiendo la actividad de la polimerasa. Por lo tanto, es necesario que el DNA obtenido tenga la pureza necesaria para evitar la interferencia. La mayoría de los métodos estándar de extracción de DNA eliminan estas sustancias, por lo que se recomienda que el método de extracción de DNA utilizado en el laboratorio esté validada para esta técnica.

Limitaciones del procedimiento

- El método detecta todos los alelos de entre 5 y 200 repeticiones de tripletes CTG (sección Resultados e interpretación).
- Las condiciones descritas para la PCR deben ser controladas con precisión. Las desviaciones de estos parámetros puede conducir a un mal resultado.
- Todo el trabajo del kit de detección Adellgene® Myotonic Dystrophy Screening debe hacerse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio y de acuerdo con las regulaciones locales, tales como la norma internacional.
- El termociclador debe ser calibrado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y utilizar dentro de los límites especificados por ellos.
- El analizador de DNA debe ser calibrado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para los fluoróforos utilizados de conformidad con los límites especificados por ellos.
- No mezclar componentes de otros kits y lotes.
- No use el kit después de la fecha de caducidad.
- No use el kit en caso de sospecha de pérdida de reactividad, la contaminación, el deterioro del envase o cualquier otra incidencia que pueda afectar al rendimiento.
- La interpretación de los resultados de los datos y el número de tripletes debe ser revisado por personal cualificado.
- Retire 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.

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

- **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 tinda. 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

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

- **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. H. Steinert, "Über das klinische und anatomische bild des muskelschwundes der myotoniker," Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde, vol. 37, p. 38, 1909.
2. F. E. Batten and H. P. Gibb, "Myotonia atrophica," Brain, vol. 32, no. 2, pp. 187–205, 1909.
3. P. S. Harper, Myotonic Dystrophy, WB Saunders, London, UK, 3rd edition, 2001.
4. J. D. Brook, M. E. McCurrach, H. G. Harley et al. et al., "Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member," Cell, vol. 68, no. 2, pp. 799–808, 1992.
5. M. Mahadevan, C. Tsilfidis, L. Sabourin et al., "Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene," Science, vol. 255, no. 5049, pp. 1253–1255, 1992.
6. Y. H. Fu, A. Pizzuti, R. G. Fenwick et al., "An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy," Science, vol. 255, no. 5049, pp. 1256–1258, 1992.
7. Amin Haghghat Jahromi^{1,2}, Masayoshi Honda³, Steven C. Zimmerman^{1,2,*} and Maria Spies^{3,*} Single-molecule study of the CUG repeat–MBNL1 interaction and its inhibition by small molecules. Nucleic Acids Research, 2013, 1–11
8. International Myotonic Dystrophy Consortium. New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). Neurology 2000;54:1218-1221
9. Moxley RT, Meola G. The Myotonic Dystrophies. In: The Molecular and Genetic Basis of Neurologic and Psychiatric Disease. Rosenberg RN, DiMauro S, Paulson HL, Ptacek L, Nestler EJ, eds. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer; 2008:532-41 .
10. Prior TW; American College of Medical Genetics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. Technical standards and guidelines for myotonic dystrophy type 1 testing. Available online. 2009. Accessed 5-8-13.
11. Kamsteeg EJ, Kress W, Catalli C, Hertz JM, Witsch-Baumgartner M, Buckley MF, van Engelen BG, Schwartz M, Scheffer H. Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. Eur J Hum Genet. 2012;20:1203–8.
12. Martorell L, Cobo AM, Baiget M, Naudó M, Poza JJ, Parra J. Prenatal diagnosis in myotonic dystrophy type 1. Thirteen years of experience: implications for reproductive counselling in DM1 families. Prenat Diagn. 2007;27:68–72.

MYOTONIC DYSTROPHY SCREENING

13. Udd B, Krahe R. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 2012;11:891–905.
14. Gharehbaghi-Schnell EB, Finsterer J, Korschineck I, Mamoli B, Binder BR. Genotype-phenotype correlation in myotonic dystrophy. *Clin Genet.* 1998;53:20–6.
15. Harper PS. *Major Problems in Neurology: Myotonic Dystrophy.* London, UK: WB Saunders.
16. de Die-Smulders CE, Howeler CJ, Thijs C, Mirandolle JF, Anten HB, Smeets HJ, Chandler KE, Geraedts JP. Age and causes of death in adult-onset myotonic dystrophy. *Brain.* 1998;121(Pt 8):1557–63.
17. Mathieu J, Allard P, Potvin L, Prevost C, Begin P. A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology.* 1999;52:1658–62.
18. Arsenault ME, Prevost C, Lescault A, Laberge C, Puymirat J, Mathieu J. Clinical characteristics of myotonic dystrophy type 1 patients with small CTG expansions. *Neurology.* 2006;66:1248–50.
19. Dean NL, Loredó-Osti JC, Fujiwara TM, Morgan K, Tan SL, Naumova AK, Ao A. Transmission ratio distortion in the myotonic dystrophy locus in human preimplantation embryos. *Eur J Hum Genet.* 2006;14:299–306.
20. De Temmerman N, Sermon K, Seneca S, De Rycke M, Hilven P, Lissens W, Van Steirteghem A, Liebaers I. Intergenerational instability of the expanded CTG repeat in the DMPK gene: studies in human gametes and preimplantation embryos. *Am J Hum Genet.* 2004;75:325–9.
21. Rakocevic-Stojanovic V, Savic D, Pavlovic S, Lavrnic D, Stevic Z, Basta I, Romac S, Apostolski S. Intergenerational changes of CTG repeat depending on the sex of the transmitting parent in myotonic dystrophy type 1. *Eur J Neurol.* 2005;12:236–7.
22. Ekström AB, Hakenäs-Plate L, Samuelsson L, Tulinius M, Wentz E. Autism spectrum conditions in myotonic dystrophy type 1: a study on 57 individuals with congenital and childhood forms. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B:918–26.
23. Douniol M, Jacqueline A, Cohen D, Bodeau N, Rachidi L, Angeard N, Cuisset JM, Vallée L, Eymard B, Plaza M, Héron D, Guilé JM. Psychiatric and cognitive phenotype of childhood myotonic dystrophy type 1. *Dev Med Child Neurol.* 2012;54:905–11.
24. Ekström AB, Tulinius M, Sjöström A, Aring E. Visual function in congenital and childhood myotonic dystrophy type 1. *Ophthalmology.* 2010;117:976–82.

Aviso al comprador

- Este producto está concebido para 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 ROX™ son marcas comerciales de Life Technologies Corporation.
- ROX™ y 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.