

## Elucigene<sup>®</sup> AAT

**Código de catálogo: AA002B2**

Elucigene<sup>®</sup> es una marca comercial de Gen-Probe Life Sciences Ltd.

ARMS<sup>™</sup> es una marca comercial de AstraZeneca UK Ltd.

NuSieve<sup>®</sup> es una marca comercial de Lonza. AmpliTaq Gold<sup>®</sup> es una marca comercial de Roche Molecular Systems Inc.

Gen-Probe Life Sciences Ltd. desarrolla y fabrica los kits Elucigene de acuerdo con sistemas de calidad homologados de acuerdo con las normas ISO9001:2008 e ISO13485:2003.

Fabricado por:  
Gen-Probe Life Sciences Ltd.  
Oaks Business Park  
Crewe Road  
Wythenshawe  
Manchester  
M23 9HZ

Datos de contacto para ponerse en contacto con los servicios de ventas, atención al cliente y asistencia técnica:

T: +49 (0) 6122 7076451

F: +49 (0) 6122 7076155

E: [customerservice@gen-probe.eu](mailto:customerservice@gen-probe.eu)

E: [technicalsupport@gen-probe.eu](mailto:technicalsupport@gen-probe.eu)

# Elucigene<sup>®</sup> AAT

Código de catálogo: AA002B2 – 50 pruebas

## Uso indicado

Para la detección cualitativa simultánea *in vitro* de los alelos PI\*S y PI\*Z del gen de la alfa-1-antitripsina (A1AT) humana en ADN extraído de muestras de sangre entera (conservada con EDTA) y muestras de manchas de sangre seca.

## Resumen y explicación

La deficiencia de la alfa-1-antitripsina (A1AT) es un trastorno autosómico recesivo que prácticamente solo padecen los caucásicos de ascendencia europea y es la causa genética más frecuente de enfermedad hepática en niños <sup>(1)</sup> y enfisema pulmonar en adultos. <sup>(2)</sup>

La alfa-1-antitripsina (A1AT) es un inhibidor de proteasa (PI) sérico circulante codificado por el locus PI (símbolo HUGO; SERPINA1), ubicado en el cromosoma 14q, que inhibe la actividad de las peptidasas, siendo su principal objetivo la elastasa de neutrófilos, particularmente en las vías respiratorias inferiores. Una deficiencia de A1AT provoca una actividad elevada de la elastasa de neutrófilos en el pulmón, lo que genera daños en la pared alveolar. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) resultante es la manifestación clínica más frecuente de la deficiencia de A1AT, aunque también puede manifestarse síntomas de anomalías hepáticas en la niñez. <sup>(3,4)</sup> En no fumadores con deficiencia de la A1AT, los primeros síntomas de enfermedad pulmonar se producen a una edad media de 45 años; sin embargo, en fumadores la edad media se reduce a los 35 años. Los fumadores con deficiencia de la A1AT también muestran un grado de destrucción pulmonar considerablemente mayor y tienen un índice de supervivencia inferior que los no fumadores. <sup>(5)</sup>

Las pruebas actuales de la deficiencia de la A1AT generalmente implican una prueba de detección bioquímica automática de rutina para identificar a pacientes con niveles séricos bajos de la glucoproteína A1AT. A continuación, se realiza una clasificación isoeléctrica (isoelectric focusing, IEF), una técnica para separar e identificar variantes de proteínas. Se han identificado muchas variantes del gen de la A1AT, pero relativamente pocas provocan una deficiencia de la A1AT grave. Existen tres variantes importantes: M, Z y S. La variante M es normal y se clasifica en subtipos. Las variantes Z y S están provocadas por mutaciones puntuales en el gen de la A1AT y están asociadas con una reducción en los niveles plasmáticos de la A1AT, además la proteína Z no funciona normalmente.

En poblaciones caucásicas, la deficiencia de la A1AT afecta aproximadamente a 1 de cada 2.500 personas, se estima que hay de 70.000 a 100.000 personas afectadas en los Estados Unidos, con cifras comparables en Europa. <sup>(6)</sup>

Las dos variantes, PI\*Z y PI\*S, en particular son conocidas por representar la mayoría de deficiencias de la A1AT, con frecuencias de portadores en caucásicos del 0,3-4% y 0,6-11% respectivamente. <sup>(7)</sup> Elucigene AAT proporciona a los laboratorios una prueba sencilla y sólida como medio de detectar rutinariamente los alelos PI\*Z y PI\*S. La metodología es rápida y sencilla a la hora de producir resultados fácilmente interpretables. La prueba proporciona información genotípica que identifica claramente a un individuo como heterocigoto (es decir, tiene una copia) u homocigoto (tiene dos copias) para los alelos PI\*Z y PI\*S.

## Principios del procedimiento

El método empleado por la prueba Elucigene AAT se basa en el sistema de mutaciones refractarias a la amplificación (ARMS), una tecnología de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) específica de los alelos que puede detectar mutaciones puntuales o pequeñas eliminaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN).<sup>(8)</sup> La prueba se compone de dos mezclas de reacción complementarias. La primera mezcla de reacción amplifica específicamente todos los alelos de la A1AT que no están afectados por las mutaciones S y Z, es decir, son naturales. Por contraste, la segunda mezcla de reacción contiene cebadores que solo amplifican específicamente los alelos mutantes S y Z. Cada mezcla de reacción incluye cebadores que amplifican las secuencias de ADN no A1AT como un control de amplificación interno del ensayo para indicar una amplificación exitosa. Los productos amplificados (amplicones) de las dos reacciones se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa, y presencia o ausencia de bandas en el gel indica el estado de los alelos PI\*S y PI\*Z.

## Advertencias y precauciones

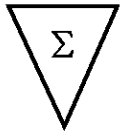
1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. El ADN de control suministrado con este kit es de origen humano y se ha probado independientemente utilizando un ensayo basado en la RCP y se ha considerado negativo para el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH1).
3. Debe tenerse precaución al manipular material de origen humano. Todas las muestras deben considerarse potencialmente infecciosas. Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que el VHB, VHC, VIH 1 u otros agentes infecciosos estén ausentes. La manipulación de muestras y componentes de pruebas, su uso, almacenamiento y eliminación deben realizarse de acuerdo con los procedimientos definidos por las normativas o pautas de seguridad nacionales relativas a peligros biológicos.
4. Almacene todos los componentes por debajo de los -20 °C. Deseche a los 3 meses de la apertura salvo que esté subalicuotado.
5. En línea con las buenas prácticas de laboratorio actuales, los laboratorios deben procesar sus propias muestras internas de control de calidad de genotipo conocido en cada ensayo, de modo que pueda evaluarse la validez del procedimiento.
6. No sustituya ni mezcle reactivos de diferentes lotes de kit o de otros fabricantes.

## Símbolos utilizados en las etiquetas

Los símbolos utilizados en todas las etiquetas y envases se ajustan al estándar armonizado EN980.



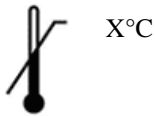
Fabricante



Número de pruebas



Consulte las instrucciones de uso



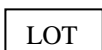
Almacenar por debajo de la temperatura indicada



Usar antes de la fecha indicada



Código de catálogo



Número de lote

## **Materiales suministrados**

El almacenamiento de los reactivos debe realizarse en un área sin productos de ADN o RCP contaminantes.

No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase. Todos los reactivos se suministran listos para usar. Almacene los reactivos abiertos y sin abrir a -20 °C. Los reactivos abiertos pueden almacenarse durante hasta 3 meses.

Se suministran materiales suficientes para 50 pruebas:

1. 2 viales x 450 µl de mezcla de cebador A (TA) que contiene cebadores específicos para la amplificación de alelos no afectados por las mutaciones S y Z, cebadores de control y trifosfatos de desoxirribonucleósido en amortiguador. (AA002TA)
2. 2 viales x 450 µl de mezcla de cebador B (TB) que contiene cebadores específicos para la amplificación de alelos afectados por las mutaciones S y Z, cebadores de control y trifosfatos de desoxirribonucleósido en amortiguador. (AA002TB)
3. 1 vial x 600 µl de tinte de carga (LD). (CR000TR)
4. 1 vial x 200 µl de amortiguador de dilución (DB). (CR000TV)
5. 1 vial x 50 µl de control de ADN (DC) es heterocigoto para la mutación S detectada por Elucigene AAT. (CR002TX)

## **Materiales necesarios pero no suministrados**

Consumibles de laboratorio: guantes; tubos de microcentrifugadora con tapas enroscables; puntas de pipeta; viales de RCP de pared fina de 0,2 ml o 0,5 ml (la utilización de dos viales de colores diferentes ayudará a la identificación de la mezcla de cebador).

Preparación de ADN: agua desionizada estéril de buena calidad; cloruro sódico (NaCl); sal disódica de ácido edético (EDTA); gránulos de hidróxido sódico (NaOH); 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol (base de Tris [trometamol]) cristalizado; ácido clorhídrico al 36% con peso específico de 1,18 (HCl); cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl).

Amplificación de RCP: aceite mineral blanco ligero Sigma;\* agua destilada estéril de buena calidad; AmpliTaq Gold (Applied Biosystems).

Electroforesis: Materiales de electroforesis en gel incluidos NuSieve<sup>®</sup> 3:1 agarosa (Lonza); Escalera de 50 pares de bases (GE Healthcare); Bromuro de etidio.

\* Para amplificación llevada a cabo en viales de RCP de 0,5 ml o termocicladores sin tapas térmicas.

## **Equipo necesario**

Equipo de laboratorio: pipetas de precisión (2 conjuntos: 1 para manipulación preamplificación y 1 para manipulación postamplificación: preferentemente pipetas de desplazamiento positivo); utensilios de vidrio; ropa protectora; agitadora vorticial; microcentrifugadora; balanza; soportes de tubos.

Preparación de ADN: bloque térmico (calentamiento a 100 °C).

Amplificación: termociclador para alojar viales de 0,5 ml o 0,2 ml (con una precisión de temperatura de +/-1 °C entre 33 °C y 100 °C y una uniformidad de temperatura estática de +/-1 °C), tapa térmica opcional.

Electroforesis: depósito de gel submarino horizontal; generador; microondas; baño de agua para enfriar la agarosa; transiluminador UV; sistema fotográfico.

## **Recogida y almacenamiento de las muestras**

Deben usarse muestras de sangre entera (EDTA) o de manchas de sangre.

Se ha informado ocasionalmente de que los dispositivos de recogida de muestras resultaron perjudiciales para la integridad de determinados análisis y pudieron interferir con algunas tecnologías metodológicas.<sup>(9)</sup> Se recomienda que cada usuario se asegure de que el dispositivo elegido se utilice de acuerdo con las instrucciones del fabricante y de que tanto los dispositivos de recogida de muestras como los métodos de preparación de ADN alternativos sean compatibles con la prueba.

Las muestras de sangre deben almacenarse a -20 °C antes de la preparación del ADN. Evite congelaciones y descongelaciones repetidas.

## ***Preparación de ADN a partir de muestras de sangre entera (EDTA)***

1. Pipetee 80 µl de cada muestra de sangre en un tubo de microcentrifugadora con tapa enroscable.
2. Pipetee 320 µl de solución de NH<sub>4</sub>Cl a 170 mM (9,09 g/l) en cada tubo.
3. Mezcle durante 20 minutos mediante giro e inversión suaves. Evite una agitación enérgica y la formación de espuma.
4. Centrifugue cada tubo durante 2 minutos a 12.000 g hasta que se forme un sedimento celular.
5. Utilizando una pipeta retire y deseche el líquido sobrenadante.
6. Pipetee 300 µl de NaCl a 10 mM (0,58 g/l)/EDTA a 10 mM (3,72 g/l) en cada tubo y vuelva a suspender las células mediante mezcla en agitadora vorticial.
7. Centrifugue cada tubo durante 1 minuto a 12.000 g hasta que se forme un sedimento celular.
8. Repita los pasos 5 a 7 al menos dos veces más hasta que se haya eliminado toda la coloración roja visible del líquido sobrenadante.
9. Utilizando una pipeta retire y deseche el líquido sobrenadante.
10. Pipetee 200 µl de solución de NaOH a 50 mM (2 g/l) en cada tubo y vuelva a suspender las células mediante mezcla en agitadora vorticial.
11. Incube en un bloque térmico a 100 °C durante 10 minutos.
12. Pipetee 40 µl de base de Tris/HCl (pH 7,5) a 1 M (121,1 g/l) en cada tubo y mezcle en agitadora vorticial.

13. Añada 1 ml de agua desionizada estéril a cada tubo de microcentrifugadora para obtener un volumen total de muestra de ADN de 1,24 ml.
14. Centrifugue cada tubo durante 1 minuto a 12.000 g hasta que se forme un sedimento de residuos celulares. El ADN está contenido dentro del líquido sobrenadante.

### ***Preparación de ADN a partir de manchas de sangre secas***

1. Perfore con sacabocados discos<sup>(b)</sup> de 2 x 3 mm de la tarjeta de muestras y deposite en un tubo con tapa enroscable de 1,5 ml.

**Deben tomarse muestras con sacabocados de las manchas en un área de la tarjeta que esté completamente saturada de sangre.**

**Perfore con sacabocados varias manchas de una tarjeta “limpia” para desechar antes de cada muestra, para evitar la contaminación de las muestras.**

2. Añada 1 ml de NaCl a 10 mM (0,58 g/l)/EDTA a 10 mM (3,72 g/l) y mezcle en un mezclador giratorio durante 15-20 minutos. Si no está disponible el mezclador giratorio puede que sea necesario prolongar los lavados hasta 30 minutos cada uno.
3. Retire y deseche la solución de lavado.
4. Repita los pasos 2 y 3 una vez más.
5. En este punto la mayor parte del pigmento hemático se debe haber extraído con disolventes del disco. En esta fase, no resulta extraña una coloración débil marrón rojiza de las manchas de sangre.
6. Centrifugue en la microcentrifugadora brevemente (3 s) para recoger el resto de solución de lavado en la parte inferior del tubo. Utilizando una pipeta, retire y deseche tanta solución de lavado como sea posible, sin alterar las manchas.
7. Este paso de breve centrifugación en la microcentrifugadora normalmente elimina los pigmentos hemáticos adicionales de las manchas de sangre.
8. Añada 150 µl de NaOH a 50 mM (2 g/l) a cada tubo. Golpee con cuidado con el dedo para mezclar.
9. Incube en un bloque térmico a 100 °C durante 10 minutos.
10. Centrifugue en la microcentrifugadora brevemente para recoger el sobrenadante en la parte inferior del tubo.
11. Añada 30 µl de base de Tris/HCl (pH 7,5) a 1 M (121,1 g/l) en cada tubo, para neutralizar, y mezcle con cuidado.
12. Añada 420 µl de agua desionizada estéril a cada muestra de ADN para obtener un volumen total de 600 µl.
13. Mezcle bien las muestras y centrifugue en la microcentrifugadora para recogerlas.

<sup>(b)</sup> El área total de muestra de sangre utilizada debe ser, al menos, equivalente a la de las manchas de sangre circulares de 2 x 3 mm. Por ejemplo, pueden utilizarse manchas de tarjeta de 1 x 6 mm si resulta conveniente.

14. Transfiera sobrenadante a un tubo nuevo con tapa enroscable etiquetado.

15. Almacene el ADN extraído a -20 °C.

Gen-Probe Life Sciences Ltd. recomienda el método de preparación de ADN descrito anteriormente y se ha demostrado que produce resultados uniformes y fiables. Puede que el ADN preparado utilizando otros métodos o procedente de otros tipos de muestras no sea óptimo para la prueba Elucigene AAT y puede que produzca resultados subóptimos. Los criterios clave para los métodos de preparación de ADN alternativos son la concentración óptima de ADN y la ausencia de inhibidores de la RCP.

Se recomienda que los métodos y tipos de muestras alternativos sean evaluados exhaustivamente con la prueba Elucigene AAT antes de que los resultados se utilicen para uso diagnóstico. No se recomienda analizar muestras de ADN a concentraciones <10 ng/5 µl. Bajo condiciones óptimas de RCP, se obtienen resultados uniformes a concentraciones de ADN entre 10 y 100 ng/5 µl.

### **Protocolo de prueba**

#### ***Procedimiento de amplificación***

**Las cifras dadas en las Tablas 1 y 2 pueden aumentarse proporcionalmente para números de pruebas diferentes de los indicados. Sin embargo, debido a los bajos volúmenes implicados, Gen-Probe Life Sciences Ltd. recomienda que no se preparen menos de 5 pruebas cada vez.**

1. Programa el termociclador de modo que un temporizador active la AmpliTaq Gold a 94 °C durante 20 minutos en secuencia con un programa de ciclos de amplificación de 30 segundos a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 62 °C (hibridación) y 1 minuto a 72 °C (extensión) durante 35 ciclos. Esto debería asociarse a un temporizador que impusiera un retraso de 10 minutos a 72 °C (extensión) en el ciclo final.

**Nota: Seleccione la opción del método 'Block' en el termociclador para RCP en viales de 0,5 ml.**

2. Descongele y centrifugue los viales de mezcla de cebador A (TA), mezcla de cebador B (TB), AmpliTaq Gold (no suministrada), tinte de carga (LD) y amortiguador de dilución (DB) durante 10 segundos a 12.000 g, mezcle suavemente en agitadora vorticial y centrifugue los viales de nuevo durante 10 segundos.

**Nota: Los pasos 3-5 deben llevarse a cabo en un área libre de ADN**

3. Tomando como referencia la Tabla 1 prepare suficiente dilución de AmpliTaq Gold (no suministrada) en el amortiguador de dilución suministrado y agua destilada estéril para el número de muestras y controles a analizar. Mezcle completamente con la pipeta succionando y soltando la solución con suavidad.

**Tabla 1. Dilución de AmpliTaq Gold en amortiguador de dilución**

	Número de pruebas necesario			
	10	20	30	40
Volumen de agua destilada estéril (µl)	42	84	126	168
Volumen de amortiguador de dilución (µl)	12	24	36	48
Volumen de tinte de carga (µl)	60	120	180	240
Volumen de AmpliTaq Gold (µl)	6	12	18	24
Volumen total (µl)	120	240	380	480

- Tomando como referencia la Tabla 2, prepare las mezclas de reacción A y B. Retire la alícuota adecuada de mezcla de cebador A a un tubo de microcentrifugadora etiquetado. Repita con la mezcla de cebador B en un segundo tubo de microcentrifugadora etiquetado. Utilizando puntas de pipeta separadas añada el volumen adecuado de la dilución AmpliTaq Gold (desde el paso 3) a cada tubo de microcentrifugadora. Mezcle suavemente con una agitadora vorticial y centrifugue los viales durante 10 segundos a 12.000 g.

**Tabla 2. Preparación de las mezclas de reacción A y B**

	Número de pruebas necesario							
	10		20		30		40	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Volumen de mezcla de cebador A (µl)	165		330		495		660	
Volumen de mezcla de cebador B (µl)		165		330		495		660
Volumen de enzima diluida (µl)	55	55	110	110	165	165	220	220
Volumen total (µl)	220	220	440	440	660	660	880	880

- Etiquete un vial con 'A' y otro vial con 'B' para cada muestra y control o, si se dispone de viales de colores, utilice diferentes colores para cada mezcla de cebador.
- Pipetee 20 µl de mezcla de reacción A preparada en la parte inferior de un número adecuado de viales de RCP etiquetados con la 'A'. Repita con la mezcla de reacción B en un número adecuado de viales de RCP etiquetados con la 'B'.
- Pipetee 5 µl de muestra de ADN de prueba o ADN de control (DC) en un par de viales A y B utilizando puntas de pipeta diferentes cada vez. Añada una gota de aceite mineral blanco ligero Sigma para cubrir la fase acuosa.\* Vuelva a tapar firmemente.
- Para el control negativo no añada ADN al par de viales A y B. Añada 1 gota de aceite mineral blanco ligero Sigma para cubrir la fase acuosa.\* Vuelva a tapar firmemente.
- Centrifugue los viales A y B durante 10 segundos a 12.000 g.
- Coloque todos los viales firmemente en el bloque del termociclador. Inicie el programa temporizador a 94 °C, seguido del programa de ciclos de amplificación.
- Deseche el resto de las mezclas de reacción A y B preparadas y la dilución AmpliTaq Gold no utilizadas.

12. Una vez terminado el programa de ciclos de amplificación, se pueden almacenar las muestras a temperatura ambiente de un día a otro o a 2-8 °C durante hasta 7 días antes de realizar el análisis mediante electroforesis en gel.

\* Para amplificación llevada a cabo en viales de RCP de 0,5 ml o termocicladores sin tapas térmicas.

### ***Electroforesis en gel***

Se recomienda que cada usuario se asegure de que el equipo elegido se utilice de acuerdo con las instrucciones del fabricante y sea compatible con esta prueba. En este contexto los parámetros clave son las dimensiones de la matriz de gel y el peine (formador de pocillos). Se han obtenido resultados utilizando las siguientes condiciones de electroforesis:

1. El producto de RCP se sometió a electroforesis en un gel de 3% NuSieve® 3:1 agarosa utilizando tris-borato con bromuro de etidio (TBE/EtBr) como amortiguador de migración. Se preparó TBE/EtBr como base de Tris a 134 mM (16,2 g/l), ácido bórico a 74,9 mM (4,63 g/l), amortiguador EDTA a 2,55 mM (0,95 g/l) con 0,1 µg/ml de bromuro de etidio.
2. Se disolvieron 3 g de NuSieve® 3:1 en 100 ml de TBE/EtBr y se vertieron en una bandeja de gel horizontal de 15 x 12 cm con formadores de pocillos de 1,5 mm x 5 mm suspendidos 1 mm por encima de la base.
3. Se incorporaron al gel 15 µl del producto de RCP (con el colorante de carga añadido durante el proceso de preparación de la RCP).
4. Se colocó una escalera de 50 pares de bases (GE Healthcare) adyacente a las muestras como marcador de tamaño molecular.
5. Se llevó a cabo la electroforesis a de 5 a 6 V/cm entre los electrodos hasta que el frontal teñido hubo migrado 4 cm de los pocillos de carga hacia el ánodo (1 a 1,5 horas).
6. Después de la electroforesis los geles se colocaron en un transiluminador UV a 260 nm, luego se visualizaron y fotografiaron.

### **Interpretación de los resultados**

1. El control negativo no debe mostrar bandas en las pistas de los viales A y B dentro del área correspondiente a 148 y 499 pares de bases.
2. Las bandas de control superior e inferior deben ser claramente visibles en cada pista correspondiente a los pares de viales A y B. Todas las bandas de productos diagnósticos deben ser claramente visibles y tener una intensidad similar a las bandas de control en ese vial.
3. Todas las pistas deben estar libres de manchas excesivas y fluorescencia de fondo.
4. La posición de las bandas de control superior e inferior debe indicar el tamaño molecular correcto, es decir, 499 y 148 pares de bases.

**Si no se observa alguno de los puntos anteriores no deben interpretarse los resultados y debe llevarse a cabo una nueva prueba.**

5. Un individuo tiene dos copias del gen de la A1AT. Cuando estas copias tienen la misma secuencia para cualquier sitio dado, un individuo se describirá como homocigoto respecto a ese sitio, p. ej., PI\*ZZ. Cuando las copias difieren en la secuencia en un sitio dado, un individuo se describirá como heterocigoto respecto a ese sitio.
6. Los productos de RCP de los cebadores de control superior e inferior se observarán como bandas en las pistas de los viales A y B del gel a 499 y 148 pares de bases respectivamente.
7. Los productos de RCP procedentes de un individuo no portador del alelo PI\*S o PI\*Z se observarán como bandas en las posiciones mostradas en la figura 1.
8. Los productos de RCP procedentes de un individuo portador del alelo PI\*Z se observarán como una banda en la pista del vial B del gel a 294 pares de bases. Los productos de RCP procedentes de un individuo no portador del alelo PI\*Z se observarán como una banda en la posición adyacente a la pista del vial A. En consecuencia, los productos de RCP procedentes de un heterocigoto PI\*Z se verán como bandas en las pistas de los viales A y B a 294 pares de bases.
9. Los productos de RCP procedentes de un individuo portador del alelo PI\*S se observarán como una banda en la pista del vial B del gel a 243 pares de bases. Los productos de RCP procedentes de un individuo no portador del alelo PI\*S se observarán como una banda en la posición adyacente a la pista del vial A. En consecuencia, los productos de RCP procedentes de un heterocigoto PI\*S se verán como bandas en las pistas de los viales A y B a 243 pares de bases.
10. Es posible detectar heterocigotos compuestos PI\*SZ utilizando Elucigene AAT.

Nota: Las muestras de homocigotos compuestos PI\*ZZ pueden producir una pequeña cantidad de producto de RCP a partir del cebador diseñado para amplificar el alelo normal para el sitio de mutación Z. Se puede observar este artefacto en la pista del vial A del gel cuando se utilizan condiciones de RCP diferentes a las optimizadas y recomendadas en la documentación sobre el producto.

La figura 1 muestra de forma esquemática el tamaño, en pares de bases, y la ubicación relativa de los productos de RCP en un gel que se espera para el genotipo de A1AT normal (no portador de las mutaciones S o Z) utilizando la prueba Elucigene AAT.

**Figura 1**

ESCALERA	RCP	TAMAÑO	MUTACIÓN
600 bp	Normal		
500 bp	Normal	499 pares de bases	Control superior
400 bp			
350 bp			
300 bp	Normal	294 pares de bases	PI*Z
250 bp	Normal	243 pares de bases	PI*S
200 bp			
150 bp	Normal	148 pares de bases	Control inferior
100 bp			
50 bp			

### Características de rendimiento

Se ha demostrado que el método recomendado descrito en el prospecto se comporta de una manera equivalente al método previamente validado utilizando doscientas muestras de sangre con EDTA analizadas con los reactivos de Elucigene AAT en un estudio 'con enmascaramiento' realizado por la propia empresa. Se confirmó cada resultado para los alelos PI\*S y PI\*Z utilizando un método alternativo. Los resultados coincidieron. De los 200 individuos analizados, 179 eran normal (no portadores de las mutaciones S o Z), 15 eran heterocigotos PI\*S y 6 eran heterocigotos PI\*Z. Todas las muestras de ADN se amplificaron con éxito y ninguna requirió la repetición de la prueba.

### Limitaciones del procedimiento

1. Los resultados obtenidos con este o cualquier otro reactivo diagnóstico deberían ser utilizados e interpretados únicamente en el contexto del cuadro clínico general. Gen-Probe Life Sciences Ltd. no será responsable de ninguna decisión clínica que se tome.
2. Debe tenerse en cuenta que el genotipo de un paciente que ha recibido un trasplante de hígado por padecer deficiencia de la A1AT no se corresponderá con el fenotipo evidente del paciente.
3. Como ocurre con cualquier prueba genética, se pueden obtener resultados erróneos de muestras de sangre que se hayan obtenido después de una transfusión sanguínea reciente.
4. La ausencia de las dos mutaciones detectadas por estos reactivos no garantiza que otras variantes del gen de la A1AT no estén presentes.

El usuario de estos reactivos debe recalcar estos puntos al informar de los resultados al médico que realiza el diagnóstico o al asesor genético.

## Referencias

1. Sveger,T. 1988. The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr.Scand.* 77:847-851.
2. Eriksson,S. 1964. Pulmonary emphysema and alpha-antitrypsin deficiency. *Acta Med.Scand.* 175:197-205.
3. Brantly,M., Nukiwa,T., and Crystal,R.G. 1988. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am.J.Med.* 84 (suppl. 6A):13-31.
4. Crystal,R.G., Brantly,M.L., Hubbard,R.C., Curiel,D.T., States,D.J., and Holmes,M.D. 1989. The alpha-antitrypsin gene and its mutations: Clinical consequences and strategies for therapy. *Chest* 95:196-206.
5. Silverman,E.K., Pierce,J.A., Province,M.A., Rao,D.C., and Campbell,E.J. 1989. Variability of pulmonary function in alpha-1-antitrypsin deficiency: Clinical correlates. *Ann.Intern.Med.* 111:982-991.
6. American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the Diagnosis and Management of Individuals with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency - *Am J Respir Crit Care Med* Vol 168. pp 818–900, 2003
7. de Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest* 2002; 122: 1818–1829
8. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
9. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).