

Elucigene[®] TRP Instrucciones de uso

Elucigene[®] es una marca comercial de Gen-Probe Life Sciences Ltd.

ARMS[®] es una marca comercial de AstraZeneca UK Ltd.

QIAamp[®] es una marca comercial del Qiagen Group

NuSieve[®] es una marca comercial de Lonza. AmpliTaq Gold[®] 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.
Heron House
Oaks Business Park
Crewe Road
Wythenshawe
Manchester
M23 9HZ

Para ventas, servicio al cliente y asistencia técnica:

T: +49 (0) 6122 7076451

F: +49 (0) 6122 7076155

E: customerservice@gen-probe.eu

E: technicalsupport@gen-probe.eu



Elucigene[®] TRP (Pruebas de riesgo de trombosis)

Código de catálogo: TH003B2 – 50 pruebas (con MTHFR)

Código de catálogo: TH002B2 – 50 pruebas (sin MTHFR)

Nota: En el caso del n.º de cat. TH002B2, no tenga en cuenta las referencias a los cebadores y el análisis de MTHFR.

Uso indicado

Para la detección cualitativa *in vitro* simultánea de mutaciones del Factor V Leiden (R506Q), de la protrombina (factor II 20210A) y de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR C677T) en DNA extraído de sangre entera (conservada con EDTA) o muestras de manchas de sangre secas.

Resumen y explicación

Se calcula que la trombosis venosa causa unas 50.000 muertes anuales en Estados Unidos, con una incidencia anual del 1 por 1000 (1). Se han documentado muchos factores de riesgo que fomentan la trombosis, tales como las intervenciones quirúrgicas, el embarazo, los anticonceptivos orales y la inmovilización prolongada (síndrome de la clase turista) (2).

El delicado equilibrio del proceso de coagulación de la sangre también se ve influido por un elemento genético. La vía bioquímica de la coagulación es compleja y contiene muchos factores que bien potencian o bien inhiben el proceso, provocando una coagulación insuficiente (hemofilia) o excesiva (trombofilia). De entre estos factores, hay tres que se han identificado como los principales y que son los responsables de la mayoría de los casos de trombofilia hereditaria (3)(4)(5). Las mutaciones en los genes de estos factores son indicadores útiles de un mayor riesgo de trombosis venosa. Estos son el factor V Leiden (R506Q), el factor II (protrombina 20210A) y la MTHFR (677C>T). La MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa) es esencial para el mantenimiento de las concentraciones de homocisteína, que influye en el proceso de coagulación de la sangre.

El factor V Leiden es la forma heredada más frecuente de la trombofilia. Las poblaciones generales de Estados Unidos y Europa presentan porcentajes de entre el 3 y el 8% de heterocigosidad en el factor V Leiden (6). La frecuencia de la homocigosidad en la mutación del factor V Leiden es de aproximadamente 1 entre 5000, aunque la prevalencia varía considerablemente de una población a otra. El riesgo de una tromboembolia venosa depende de factores tanto genéticos como «adquiridos». La edad es un factor importante; el aumento del riesgo con la edad es más rápido en individuos con una mutación del factor V Leiden. Un heterocigótico individual para la mutación del factor V Leiden tiene 7 veces más probabilidades de presentar tromboembolia venosa; un homocigótico individual para el factor V Leiden tiene un riesgo 80 (ochenta) veces mayor (7). Otros factores de riesgo genéticos (protrombina 20210A y MTHFR 677C) también contribuyen a aumentar el riesgo; p. ej., un heterocigótico para el factor V Leiden tiene 20 veces más riesgo si también es heterocigótico para la 20210A (8). En las mujeres que utilizan anticonceptivos orales, el riesgo de trombosis venosa es 30 veces mayor si son heterocigóticas para el factor V Leiden, o varios cientos de veces mayor si son homocigóticas para el factor V (9).

Por lo general, las pruebas están dirigidas a pacientes de menos de 50 años con trombosis venosa y a pacientes o familiares con antecedentes familiares de trastornos tromboticos. También es conveniente realizar las pruebas a los familiares de individuos que tengan factor V Leiden y a las mujeres que presenten pérdida fetal recurrente, preeclampsia grave o

muerte fetal. El conocimiento del estado del factor V Leiden puede influir en el tratamiento de un embarazo o en el proceso de toma de decisiones sobre anticonceptivos orales (10). Una vez identificado el factor V Leiden, la comprobación de otros factores de riesgo de trombosis, como la protrombina (factor II) y la MTHFR, puede aportar información valiosa. La ventaja de la identificación de mutaciones del factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa consiste en que los miembros asintomáticos de sus familias pueden optar por determinar si ellos también tienen un mayor riesgo y, así, facilitar el establecimiento de su tratamiento antitrombótico durante periodos de mayor riesgo, como durante intervenciones quirúrgicas, embarazos, toma de anticonceptivos orales o largos periodos de inmovilización, como viajes largos en avión (11).

Principios del procedimiento

El método empleado por la prueba Elucigene TRP se basa en el sistema de mutaciones refractarias a la amplificación (ARMS), una tecnología de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) específica de los alelos que puede detectar mutaciones puntuales o pequeñas eliminaciones en el ácido desoxirribonucleico (DNA)(12). La prueba se compone de dos mezclas de reacción complementarias. La primera mezcla de reacción amplifica específicamente todos los alelos de las TRP que no se ven afectados por las mutaciones del factor V Leiden (R506Q), el factor II (protrombina 20210A) y la MTHFR (677C>T), p. ej., el natural. A diferencia de la primera, la segunda mezcla de reacción contiene cebadores que amplifican específicamente sólo los alelos mutantes de R506Q, 20210A y 677C>T. Cada mezcla de reacción incluye cebadores que amplifican las secuencias de DNA no factor V Leiden, protrombina ni MTHFR 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 sobre un gel de agarosa; la presencia o ausencia de bandas en el gel indica el estado de los alelos del factor V Leiden (R506Q), el factor II (protrombina 20210A) y la MTHFR (677C>T).

Advertencias y precauciones

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. El DNA 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 abrir salvo que haya sido subdividido en alícuotas.
5. En línea con las buenas prácticas de laboratorio actuales, los laboratorios deben procesar sus propias muestras de control de calidad interno de genotipo conocido en cada ensayo, para sí poder evaluar la validez del procedimiento.

Símbolos utilizados en las etiquetas

Los símbolos utilizados en todas las etiquetas y envases cumplen el estándar armonizado EN 980.



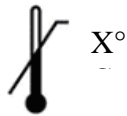
Fabricante



Número de pruebas



Consultar 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 DNA o RCP contaminantes.

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 de 450 µl de mezcla de cebador A (TA) con cebadores específicos para la amplificación de alelos no afectados por las mutaciones del factor V, del factor II ni de la MTHFR, cebadores de control y trifosfatos de desoxinucleótidos en tampón (TH003TA, TH002TA (sin MTHFR)).
2. 2 viales de 450 µl de mezcla de cebador B (TB) con cebadores específicos para la amplificación de alelos afectados por las mutaciones del factor V, del factor II o de la MTHFR, cebadores de control y trifosfatos de desoxinucleótidos en tampón (TH003TB, TH002TB (sin MTHFR)).
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 de 50 µl de DNA de control (DC), normal para las mutaciones del factor V Leiden R506Q, y de la protrombina 20210A y homocigótico para la variante de alelos de la MTHFR 677C. (CR002TX)

Materiales necesarios pero no suministrados

Consumibles de laboratorio: guantes, tubos de microcentrifugadora con tapa enroscable, puntas de pipeta, viales de RCP de 0,2 ml o 0,5 ml y pared fina (el uso de dos viales de diferente color facilitará la identificación de la mezcla de cebadores).

Preparación de DNA: agua desionizada estéril de buena calidad, cloruro sódico (NaCl), sal disódica de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), gránulos de hidróxido sódico (NaOH), 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (base de Tris) cristalizado, ácido clorhídrico (HCl) al 36% con gravedad específica de 1,18, y cloruro amónico (NH₄Cl).

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

Electroforesis: material para electroforesis en gel, como NuSieve® 3:1 agarosa (Lonza), escalera de 50 pares de bases (GE Healthcare) y 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 juegos: 1 para manipulación previa a la amplificación y 1 para la manipulación posterior a la amplificación: preferiblemente pipetas de desplazamiento positivo), instrumental de vidrio, ropa protectora, agitadora vorticial, microcentrifugadora, balanza y gradillas de tubos.

Preparación de DNA: 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: tanque de gel submarino horizontal, fuente de alimentación, microondas, baño de agua para enfriar la agarosa, transiluminador UV y 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(9). 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 DNA alternativos sean compatibles con la prueba.

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

Preparación de DNA 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 NH₄Cl 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 10 mM (0,58 g/l)/EDTA 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 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) 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 DNA 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 DNA está contenido dentro del líquido sobrenadante.

Preparación de DNA a partir de manchas de sangre secas

1. Perfore con sacabocados discos^(b) 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» y deséchelas antes de obtener cada muestra, para evitar la contaminación de las muestras.

2. Añada 1 ml de NaCl 10 mM (0,58 g/l)/EDTA 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 segundos) 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 50 mM (2 g/l) a cada tubo. Golpee con cuidado con el dedo para mezclar.
9. Hierva en el bloque térmico durante 10 minutos. El bloque térmico debe equilibrarse a 100 °C.
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) 1 M (121,1 g/l) en cada tubo, para neutralizar, y mezcle con cuidado.
12. Añada 420 µl de agua Sigma estéril a cada muestra de DNA para obtener un volumen total de 600 µl.
13. Mezcle bien las muestras y centrifugue en la microcentrifugadora para recogerlas.
14. Transfiera sobrenadante a un tubo nuevo con tapa enroscable etiquetado.

Almacene el DNA extraído a -20 °C.

^(b) 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.

El DNA Blood Kit (kit de sangre de DNA) QIAamp (Qiagen) también se ha utilizado para la preparación de DNA a partir de sangre líquida entera y se ha observado que produce resultados reproducibles e interpretables.

Gen-Probe Life Sciences recomienda los métodos de preparación de DNA descritos anteriormente, y se ha demostrado que produce resultados uniformes y fiables. Puede que el DNA preparado utilizando otros métodos o procedente de otros tipos de muestras no sea óptimo para la prueba Elucigene TRP y puede que produzca resultados subóptimos. Los criterios clave para los métodos de preparación de DNA alternativos son la concentración de DNA 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 TRP antes de que los resultados se utilicen para uso diagnóstico. No se recomienda analizar muestras de DNA a concentraciones <10 ng/5 µl. Bajo condiciones óptimas de RCP, se obtienen resultados uniformes a concentraciones de DNA entre 10 y 100 ng/5 µl.

Nota: Debido a las variaciones en la calidad y la producción de DNA, algunas veces puede ser necesario diluir adicionalmente la solución de DNA final con un factor de dilución 1:5 para garantizar una amplificación eficiente.

Protocolo de la 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 recomienda que no se preparen menos de 5 pruebas cada vez.

1. Programe el termociclador de modo que un programa 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), 2 minutos a 58 °C (hibridación) y 1 minuto a 72 °C (extensión) durante 35 ciclos. Esto debería asociarse a un programa temporizador que impusiera un retraso de 20 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 cebadores A (TA), mezcla de cebadores 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 3-6 deben llevarse a cabo en un área libre de DNA

3. Tomando como referencia la Tabla 1, prepare suficiente dilución de AmpliTaq Gold en el amortiguador de dilución y el tinte de carga suministrados 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

	Número de pruebas necesario			
	5	10	20	50
Volumen de agua destilada estéril (µl)	21	42	84	210
Volumen de tinte de carga (µl)	30	60	120	300
Volumen de amortiguador de dilución (µl)	6	12	24	60
Volumen de AmpliTaq Gold (µl)	3	6	12	30
Volumen total (µl)	60	120	240	600

4. Tomando como referencia la Tabla 2, prepare las mezclas de reacción A y B. Retire la alícuota adecuada de mezcla de cebadores A a un tubo de microcentrifugadora etiquetado. Repita con la mezcla de cebadores B en un segundo tubo de microcentrifugadora etiquetado. Utilizando puntas de pipeta separadas añada el volumen adecuado de la dilución AmpliTaq Gold (como en 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							
	5		10		20		50	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Volumen de mezcla de cebadores A (µl)	82,5		165		330		825	
Volumen de mezcla de cebadores B (µl)		82,5		165		330		825
Volumen de enzima diluida (µl)	27,5	27,5	55	55	110	110	275	275
Volumen total (µl)	110	110	220	220	440	440	1100	1100

- Etiquete un vial con «A» y otro vial con «B» para cada muestra o, si se dispone de viales de colores, utilice diferentes colores para cada mezcla de cebadores.
- Pipetee 20 µl de mezcla de reacción A preparada en la parte inferior de todos los viales de RCP etiquetados con la «A». Repita con la mezcla de reacción B en todos los viales de RCP etiquetados con la «B».
- Utilizando puntas de pipetas diferentes cada vez, añada 5 µl de muestra de DNA analítico en los viales A y B de cada uno de los pares. Añada una gota de aceite mineral blanco ligero Sigma para cubrir la fase acuosa*. Vuelva a tapar firmemente.
- Para el control negativo no añada DNA a uno de los pares 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.
- 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:

- El producto de RCP se sometió a electroforesis en un gel de agarosa NuSieve® 3:1 al 3% utilizando tris-borato con bromuro de etidio (TBE/EtBr) como amortiguador de migración. Se preparó TBE/EtBr como base de Tris 134 mM (16,2 g/l), ácido bórico 74,9 mM (4,63 g/l), amortiguador EDTA 2,55 mM (0,95 g/l) con 0,1 µg/ml de bromuro de etidio.
- 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.
- Deben cargarse 15 µl del producto de RCP de cada vial de RCP en posiciones de pocillos adyacentes del gel de agarosa preparado.

- Se colocó una escalera de 50 pares de bases (GE Healthcare) adyacente a las muestras como marcador de peso molecular.
- 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).
- Después de la electroforesis los geles se colocaron en un transiluminador UV a 260 nm, luego se visualizaron y fotografiaron.

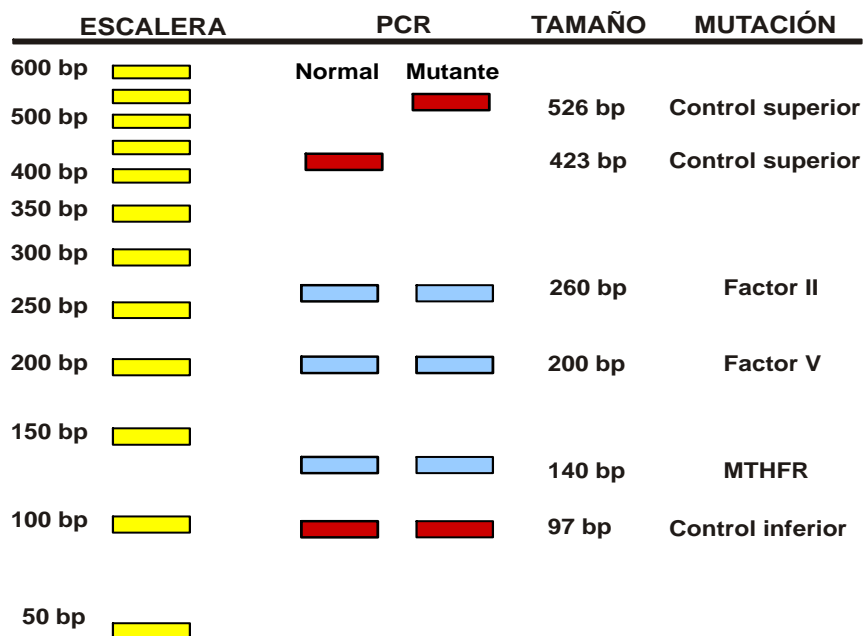
Interpretación de los resultados

- El control negativo no debe mostrar bandas dentro del área definida por las banda de control superior e inferior (véase la Figura 1).
- Las bandas de control superior e inferior deben estar claramente visibles en todas las muestras (véase la Figura 1).
- La posición de las bandas de control superior e inferior debe indicar el tamaño molecular correcto (véase la Figura 1).

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

La Figura 1 muestra un diagrama del tamaño, en pares de bases, y la ubicación relativa de los productos de la RCP en un gel que se espera para un genotipo de trombosis heterocigótico (con mutaciones del factor V, el factor II o la MTHFR) utilizando el reactivo de la prueba de riesgo de trombosis.

Figura 1



Nota: El Elucigene TRP n.º de cat. TH002B2 no detecta alelos de la MTHFR.

Características de rendimiento

Un estudio interno utilizó el kit Elucigene TRP (TH003B2) y el protocolo recomendado del kit para analizar treinta muestras previamente genotipadas mediante análisis de digestión enzimática de restricción. Se amplificaron con éxito veintinueve muestras de DNA utilizando el kit Elucigene TRP. Una muestra de DNA no pudo amplificarse pero dio un resultado aceptable al repetir la prueba. Veintiséis de las muestras dieron positivo para mutaciones detectadas por el kit Elucigene TRP; no se detectaron mutaciones en cuatro muestras. De las 30 muestras analizadas, 7 dieron positivo para mutación del factor V (R506Q), 10 dieron positivo para mutación del factor II (protrombina 20210A) y 16 dieron positivo para mutación de la MTHFR (677C>T). Todos los resultados determinados por el kit Elucigene TRP fueron confirmados por los resultados originales del genotipado.

Un estudio interno utilizó el kit Elucigene TRP (TH003B2) y el protocolo recomendado del kit para analizar treinta muestras emparejadas de sangre entera y manchas de sangre obtenidas de treinta individuos. Dieciocho de las muestras emparejadas dieron positivo para mutaciones detectadas por el kit Elucigene TRP. El resultado obtenido con cada muestra de sangre entera concordó con el obtenido utilizando la muestra de mancha de sangre del mismo individuo.

Limitaciones del procedimiento

1. Los resultados de este y otros ensayos diagnósticos deben interpretarse junto con otros datos clínicos y de laboratorio de los que disponga el médico.
2. La ausencia de las mutaciones detectadas por este kit no garantiza la ausencia de otras mutaciones en los genes del factor V Leiden, del factor II y de la MTHFR. Es posible que haya otras mutaciones y que no sean detectadas por este kit.
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.

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

Referencias

1. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, Lohse CM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb Haemost* 2001;86:452-463.
2. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999;82:610-619.
3. Bertina RM, Rosendaal FR. Venous thrombosis – the interaction of genes and environment. *N Engl J Med* 1998;338:1840-1841.
4. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996 Nov 15;88:3698-3703.
5. Press RD, Bauer KA, Kujovich JL, Heit JA. Clinical utility of factor V Leiden (R506Q) testing for the diagnosis and management of thromboembolic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1304-1318.
6. Zöller B, Hillarp A, Berntorp E, Dahlback B. Activated protein C resistance due to a common factor V gene mutation is a major risk factor for venous thrombosis. *Ann Rev Med* 1997;48:45-58.
7. Makris M, Preston FE, Beauchamp NJ, Cooper PC, Daly ME, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ. Co-inheritance of the 20210A allele of the prothrombin gene

- increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 1997;78:1426-1429.
8. Endler G, Mannhalter C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clin Chim Acta* 2003;330:31-55.
 9. Hirsch DR, Mikkola KM, Marks PW, Fox EA, Dorfman DM, Ewenstein BM, Goldhaber SZ. Pulmonary embolism and deep venous thrombosis during pregnancy or oral contraceptive use: prevalence of factor V Leiden. *Am Heart J* 1996;131:1145-1148.
 10. Bokarewa MI, Bremme K, Blomback M. Arg506-Gln mutation in factor V and risk of thrombosis during pregnancy. *Br J Haematol* 1996;92:473-478.
 11. Spector EB, Grody WW, Matteson CJ, Palomaki GE, Bellissimo DB, Wolff DJ, et al. Technical standards and guidelines: venous thromboembolism (factor V Leiden and prothrombin 20210G>A testing): a disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. *Genet Med*. 2005 Jul-Aug;7(6):444-53
 12. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
 13. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).