

**GenVInSet**  
**LACTOSE INTOLERANCE**

# Instrucciones de Uso

Kit para la determinación de C13910T  
y G22018A

Referencia GVS-LAC-48 (48 tests)  
GVS-LAC-24 (24 tests)

Conservar de  $-18$  a  $-30^{\circ}\text{C}$



Rev 02 / 29-09-2020



Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.  
Camino del Pílon 86, Casa 7 Local. 50011- Zaragoza - Spain  
[www.bdrdiagnostics.com](http://www.bdrdiagnostics.com)

# Indice

1. Uso	3
2. Resumen y explicación	4
3. Principios del procedimiento	7
4. Contenido del kit	8
5. Almacenamiento del kit	9
6. Materiales requeridos pero no suministrados	10
7. Recolección y preparación de muestras	11
8. Procedimiento de uso	12
9. Resultados	14
10. Control de calidad	16
11. Datos específicos de funcionamiento	17
12. Limitaciones del procedimiento	18
13. Guía de solución de problemas	19
14. Referencias	22
15. Aviso al comprador	24
16. Cambios respecto a la version 00	25
17. Símbolos de las etiquetas	26

# 1. Uso

GENVINSET® Lactose Intolerance es un kit para la determinación de los polimorfismos C13910T y G22018A del gen *MCM6* mediante PCR en Tiempo Real utilizando primers específicos y sondas de hidrólisis (tecnología TaqMan®).

## 2. Resumen y explicación

La lactosa es un disacárido que se puede encontrar en la leche de los mamíferos y es hidrolizada en el intestino por la enzima lactasa (también conocida como enzima lactasa-floricina hidrolasa o LPH), que produce dos monosacáridos absorbibles, glucosa y galactosa. En la mayoría de los niños, la actividad de la lactasa está en su apogeo durante el período perinatal y es esencial para la alimentación durante la lactancia, pero después de unos meses su actividad disminuye gradualmente a niveles casi indetectables debido a una baja regulación natural de la expresión de lactasa (1). Sin embargo, algunos humanos mantienen la actividad de la lactasa en la edad adulta, y después de los 2 - 12 años se puede encontrar un grupo de "no persistencia de lactasa" con baja actividad de lactasa (hipolactasia primaria) y un grupo de "persistencia de lactasa" que mantienen la capacidad de digerir leche (2,3). La frecuencia de esta persistencia varía mucho según la región: es alta en las poblaciones del norte de Europa (> 90% en Suecia y Dinamarca), mientras que disminuye progresivamente hacia el sur de Europa y Oriente Medio (alrededor del 50% en Francia, España y algunas poblaciones árabes), y es muy baja en las poblaciones asiáticas y africanas, aunque es común en las poblaciones de pastores (alrededor del 1% en China, 5-20% en África Oriental) (4).

4

La baja actividad de la lactasa durante la edad adulta conduce a una mala digestión de la lactosa, que es asintomática cuando no se ingiere leche o alimentos que contengan lactosa (5). Sin embargo, con la ingesta de lactosa y si aparecen síntomas, se puede diagnosticar intolerancia a la lactosa. La lactosa indigesta es fermentada por microflora que coloniza la luz del intestino, produciendo ácidos grasos de cadena corta, hidrógeno (H<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (6). Estos subproductos pueden causar dolor y distensión abdominal, hinchazón, flatulencia y diarrea (provocados por la acidificación del colon por lactosa indigerida) (1). Aparecen otros síntomas menos comunes, como dolor de cabeza, letargo, pérdida de concentración o vértigo porque los metabolitos tóxicos producidos por las bacterias pueden alterar los mecanismos de señalización celular. Los síntomas normalmente no son perceptibles hasta que la actividad de lactasa sea inferior al 50%. Además, muchas personas con falta de persistencia de lactasa pueden tolerar pequeñas cantidades de lactosa sin síntomas, y la tolerancia se puede adquirir mediante la adaptación de la flora intestinal con la ingesta regular de lactosa (aunque la expresión de lactasa no cambia) (7).

Por lo tanto, no todos los pacientes con deficiencia de lactasa desarrollan intolerancia a la lactosa. Por otro lado, la hipolactasia primaria no debe confundirse con la hipolactasia secundaria (causada por afecciones como

la enfermedad celíaca o la enfermedad de Crohn) y la deficiencia congénita de lactasa, una enfermedad autosómica recesiva extremadamente rara que afecta a los recién nacidos y puede resultar fatal si no se trata (8).

El gen que codifica la lactasa (*LCT*) se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2. Al menos seis mutaciones se han asociado con la expresión de lactasa, pero las lactasas entre adultos con persistencia de lactasa e hipolactasia son idénticas, ya que las diferencias radican en algunas mutaciones silenciosas (9). En las poblaciones europeas, un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) es responsable de la persistencia de la lactasa. La variante, conocida como LCT-13910C>T, se encuentra en el intrón 13 del gen de mantenimiento de minicromosomas tipo 6 (*MCM6*), 13.910 pb secuencia arriba del codón de iniciación de *LCT*. Se hereda de forma autosómica dominante, siendo suficiente un alelo para conferir el fenotipo de persistencia de lactasa. Por otro lado, LCT-22018G>A, un polimorfismo (ubicado a 22.018 pb del codón de iniciación de *LCT*, en el intrón 9 de *MCM6*), se encontró asociado con LCT-13910C>T en la mayoría de los casos, con algunas excepciones (2,3,10 –12). En general, se acepta que el genotipado del polimorfismo LCT-13910C>T se correlaciona con mayor precisión con la persistencia de la lactasa en las poblaciones europeas (donde está ~ 86% -98% asociado) y, por lo tanto, debe usarse en el diagnóstico de hipolactasia de tipo adulto (13– 16). Sin embargo, este polimorfismo no es un buen indicador de la persistencia de lactasa en los no europeos, ya que las poblaciones de pastores de África y Asia, aunque muestran una alta prevalencia de persistencia de lactasa, tienen una baja tasa del alelo LCT-13910T (17). En el norte de China y las poblaciones brasileñas japonesas, se determinó que LCT-22018G>A es más preciso para el diagnóstico de hipolactasia. (12,18)

Se cree que la persistencia de la lactasa apareció en el proceso de domesticación del ganado hace unos 10.000 años. La conservación de los haplotipos en los alelos involucrados manifiesta que estos alelos han sufrido una fuerte selección positiva en las poblaciones adultas que consumen leche (de hasta 4-5% por generación), mientras que en las poblaciones no consumidoras la aparición de persistencia de lactasa se asocia a la deriva genética. La variedad de polimorfismos relacionados con la persistencia de la lactasa demuestra que las mutaciones se desarrollaron de forma independiente un número de veces en diferentes partes del mundo (19,20).

Hay varias formas de diagnosticar la malabsorción e intolerancia a la lactosa. Un diagnóstico definitivo no es posible solo con síntomas clínicos, ya que pueden ser producidos por otras enfermedades como el síndrome del intestino irritable (SII) (1). La prueba de aliento mide el aumento de H<sub>2</sub> después de la ingesta de lactosa, pero puede mostrar falsos positivos y, lo que es más

## **LACTOSE INTOLERANCE**

importante, falsos negativos debido al sobrecrecimiento bacteriano y a las bacterias no productoras de hidrógeno en el colon, respectivamente (21). Una biopsia del duodeno que evalúa la actividad de la lactasa es una forma común de diagnóstico, aunque existen algunas limitaciones, como la expresión no homogénea de la lactasa y la invasividad de la prueba (1,22). Las pruebas genéticas han surgido como una forma más útil de detectar la persistencia de lactasa, con la limitación de los diferentes SNP en poblaciones árabes y africanas. Otras limitaciones tanto de la biopsia como de las pruebas genéticas son que la deficiencia secundaria de lactasa no se tiene en cuenta y que los síntomas no se evalúan, mientras que solo aparecen en una fracción de las personas con deficiencia de lactasa (23).

### 3. Principios del procedimiento

El kit Genvinset® Lactose Intolerance permite la determinación de los polimorfismos C13910T y G22018A situados en los intrones 9 y 13 del gen *MCM6*, mediante una PCR en tiempo real, monitorizada mediante sondas tipo Taq-Man®. Se precisan dos pocillos por paciente para completar la determinación de los dos loci.

Esta técnica proporciona un alto grado de resolución, alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad.

(\*) Ver Limitaciones del Procedimiento (sección 12)

## 4. Contenido del kit

### GVS-LAC-24 (24 tests)

- GVS-CT139-PM: Primer Mix C13910T (PM). 1 vial x 110 µL
- GVS-CT139-MM: Master Mix C13910T (MM). 1 vial x 138 µL
- GVS-GA220-PM: Primer Mix G22018A (PM). 1 vial x 110 µL
- GVS-GA220-MM: Master Mix G22018A (MM). 1 vial x 138 µL
- GVS-LAC-C1: Positive Control 1 (C1). 1 vial x 10 µL
- GVS-LAC-C2: Positive Control 2 (C2). 1 vial x 10 µL
- GVS-RB: Reaction Blank (RB). 1 vial x 100 µL

### GVS-LAC-48 (48 tests)

- GVS-CT139-PM: Primer Mix C13910T (PM). 2 viales x 110 µL
- GVS-CT139-MM: Master Mix C13910T (MM). 2 viales x 138 µL
- GVS-GA220-PM: Primer Mix G22018A (PM). 2 viales x 110 µL
- GVS-GA220-MM: Master Mix G22018A (MM). 2 viales x 138 µL
- GVS-LAC-C1: Positive Control 1 (C1). 1 vial x 10 µL
- GVS-LAC-C2: Positive Control 2 (C2). 1 vial x 10 µL
- GVS-RB: Reaction Blank (RB). 1 vial x 100 µL

## 5. Almacenamiento del kit

Todos los reactivos del kit deben ser almacenados entre -18°C y -30°C y son estables a esta temperatura hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. No realizar más de 3 ciclos de congelación/descongelación a los viales de Primer Mix (GVS-CT139-PM y GVS-GA220) y de Master Mix (GVS-CT139-MM y GVS-GA220) ya que podría reducir la sensibilidad del ensayo y alterar los resultados.

Debido a la naturaleza fotosensible del reactivo, evitar la exposición continuada a la luz.

# Material requerido pero no suministrado

## General

- Guantes
- Bata

## Consumibles

- Puntas con filtro (P200, P100 y P10)
- Tubos 1.5 mL autoclavados
- Fungible específico de instrumento qPCR (en caso de utilizar RotorGene Q, sólo se admiten tubos de 0.1mL)

## Equipamiento

- Instrumento q-PCR con canales de detección para FAM y HEX. Los siguientes equipos han sido validados:
  - Light Cycler® 96
  - StepOne™
  - DTLite
  - Rotor-Gene Q
  - Applied Biosystems® 7500
  - CFX96™
- Vórtex
- Pipetas (P200, P100 y P10)

## 7. Recolección y preparación de las muestras

Este test únicamente puede ser utilizado con muestras de sangre completa recogidas en tubos con anticoagulantes EDTA o citrato. La heparina puede interferir con la PCR y no debe utilizarse en este procedimiento.

Se recomienda validar el sistema de extracción de ADN con GENVINSET® Lactose Intolerance antes de emitir resultados con fines diagnósticos.

### **i** Precaución

Todas las muestras biológicas y de sangre deben tratarse como potencialmente infecciosas. Al manipularlas, siga las precauciones básicas o "universales". Cualquier manipulación de las muestras debe efectuarse con guantes y protección adecuada.

## 8. Procedimiento de uso

### A) Preparación de la PCR

# i Precauciones

- Descongelar todos los componentes del kit antes de comenzar el ensayo, mezclar y centrifugar.
- Trabajar en hielo o sobre un bloque frío.
- La PCR se debe montar en la zona prePCR.
- Utilizar sólo puntas con filtro y tubos de 1.5 mL autoclavados.
- Utilizar siempre guantes y bata.
- En cada sesión se recomienda testar el control de contaminación (RB) así como los controles (C1/C2) incluidos en el kit.

12

1. Sacar las muestras del congelador. Vortear (o golpear con el dedo).
2. Preparar la mezcla del Primer Mix y de la Master Mix para n+1 muestras, para cada uno de los polimorfismos (C13910Y y G22018A):

	Vol. por muestra (µL)
Primer Mix (C13910T o G22018A)	4
Master Mix (C13910T o G22018A)	5

3. Pipetear 9 µL de cada una de estas mezclas (C13910T PM+MM y G22018A PM+MM) en los pocillos de PCR colocados sobre un soporte frío y añadir 1 µL de la muestra de ADN, o de Control o de Reaction Blank en el caso del pocillo de control de contaminación.
4. Sellar la placa con la cubierta adecuada y centrifugar 1 minuto a 360 x g para asegurarse de que todo el volumen se deposita en el fondo de pocillo.
5. Introducir la placa en el termociclador y comenzar el programa de amplificación descrito a continuación.

**B) Configuración del termociclador**

1. Configurar el siguiente programa de amplificación.:

	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (mm:ss)	Análisis
Desnaturalización	1	95	05:00	X
Ciclos	40	95	00:15	X
		60	1:00	Sencillo
Enfriamiento	1	15	∞	X

2. Configurar los canales de lectura.

La fluorescencia emitida debe leerse en los canales FAM (495-520 nm) y HEX (535-554 nm). En todos los pocillos deben detectarse dichas fluorescencias (reacción bplex).

**NOTA – Parámetros especiales en el termociclador Rotor-Gene Q:**

- a. Abrir el software Rotor-Gene Q y en la ventana “New Run”, seleccionar la pestaña “Advanced” y hacer clic en “New”.
- b. Seleccionar el formato de rotor que se vaya a utilizar, siempre con tubos de 0.1 mL. Activar la opción “Locking Ring Attached” y a continuación “Next”.
- c. Fijar el volumen de reacción en 10 µL, e identificar el operario y la muestra si se desea.
- d. Hacer clic en “Edit Profile” y configurar el programa de amplificación tal como se indica en el apartado anterior. Seleccionando el paso de 60 segundos a 60 °C, hacer clic en “Acquiring to Cycling A”. Seleccionar los canales “Green” y “Yellow”, y a continuación “OK”. Hacer clic en “OK” para aceptar y cerrar la ventana “Edit Profile”.
- e. Hacer clic en “Gain Optimisation” en el menú desplegable “Run New Wizard” para abrir la ventana “Auto-Gain Optimization Setup”. En el menú desplegable de “Channel Settings” seleccionar “Acquiring Channels” y a continuación “Add”. En la ventana “Auto-Gain Optimisation Channel Settings”, escribir los siguientes parámetros para cada canal (“Green” y “Yellow”):
  - Tube position = 1
  - Target Sample Range: 5 FI up to 10 FI
  - Acceptable Gain Range: -10 to 10
- f. Activar la opción “Perform Optimisation Before 1st Acquisition”, y a continuación hacer clic en “Close”.
- g. Pulsar “Next” y “Start Run” en la ventana “New Run Wizard”.

## 9. Resultados

GenVInSet® Lactose Intolerance constituye una técnica cualitativa que permite la determinación de la presencia o ausencia de los polimorfismos C o T en la posición 13910 antes del inicio del gen LCT y G o A 22018 pares de bases antes de dicho gen.

No es necesaria la utilización de ninguna referencia pasiva.

En el software que controla el termociclador, seleccionar como tipo de análisis el genotipado (genotyping, allelic discrimination, scatter plot, etc.). Seleccionar el canal FAM (mutación) en el eje Y, y el canal HEX (wildtype) en el eje X de la gráfica.

El genotipo de cada muestra se determina calculando el ratio entre las señales detectadas en el canal HEX (normal) y en el canal FAM (mutado). La mayoría de softwares de PCR en tiempo real automáticamente agrupan las muestras en diferentes regiones en un diagrama de dispersión (scatter plot). Si se han seleccionado los ejes tal como se describe anteriormente, los puntos representados junto al eje X corresponden a muestras normales (wildtype/wildtype), los puntos junto al eje Y son muestras homocigotas mutadas, y el grupo que queda en la mitad del gráfico representa las muestras heterocigotas. El control de contaminación (RB) aparece en el eje de coordenadas.

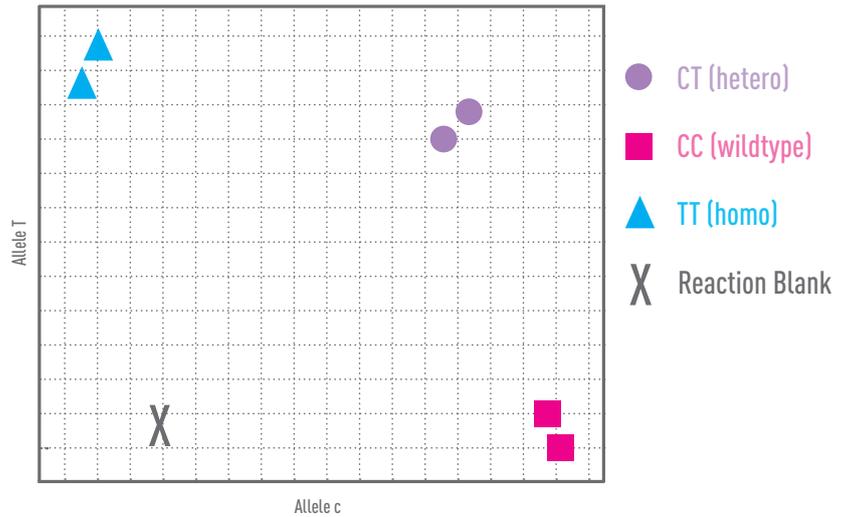
14

Genotipo	Amplificación en FAM (520nm)	Amplificación en HEX (554nm)
Normal (wt/wt)	NO	SÍ
Hetero (wt/mut)	SÍ	SÍ
Homocigota mutada (mut/mut)	SÍ	NO
Blanco	NO	NO

Algunos instrumentos necesitan una configuración manual del umbral (threshold) para realizar una asignación de genotipo precisa. El valor de threshold para FAM debe situarse justo por encima de la fluorescencia de fondo generada por el control wildtype (C1 – positivo para HEX). Y viceversa, el threshold para HEX debe fijarse justo por encima de la señal de fondo dada por el control mutado (C2 – positivo para FAM).

Resultados de C13910T

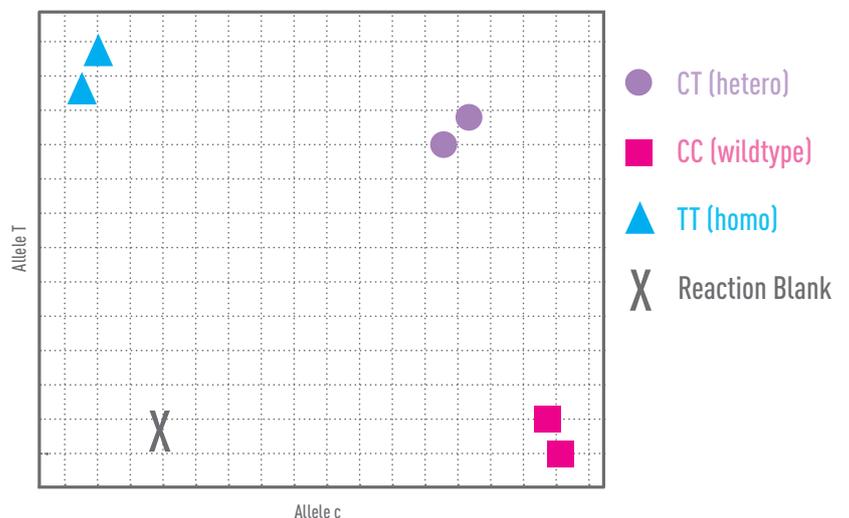
El alelo C hibrida con la sonda marcada con HEX, mientras que el alelo T hibrida con la sonda marcada con FAM. Cuando se detecta una fuerte señal en el canal HEX (554nm) y no hay señal o sólo una señal de fondo en el canal FAM (520nm) la muestra es homocigota wildtype (CC). Por el contrario, si la única señal intensa es la de FAM, la muestra es homocigota mutada (TT). Por último, cuando se detecta fluorescencia tanto en FAM como en HEX, la muestra analizada es heterocigota (CT) ya que ambas sondas se unen a amplicones y generan señales intermedias en ambos canales.



15

Resultados de G22018A

El alelo G hibrida con la sonda marcada con HEX, mientras que el alelo A hibrida con la sonda marcada con FAM. Cuando se detecta una fuerte señal en el canal HEX (554nm) y no hay señal o sólo una señal de fondo en el canal FAM (520nm) la muestra es homocigota wildtype (GG). Por el contrario, si la única señal intensa es la de FAM, la muestra es homocigota mutada (AA). Por último, cuando se detecta fluorescencia tanto en FAM como en HEX, la muestra analizada es heterocigota (GA) ya que ambas sondas se unen a amplicones y generan señales intermedias en ambos canales.



## 10. Control de Calidad

Debido a la naturaleza cualitativa de este test, no será necesario realizar una calibración.

Deben cumplirse los siguientes criterios para que el ensayo se considere válido:

- El control de contaminación (RB) debe proporcionar resultado negativo tanto para FAM como para HEX, considerando valores de Cp (Crossing Point) >35 como resultado negativo. Valores de Cp <35 indicarán una contaminación por lo que toda la sesión debe quedar invalidada.
- La muestra control C1 debe proporcionar fluorescencia positiva sólo para HEX (wt). La muestra control C2 debe proporcionar resultados positivos sólo para FAM (mut).
- Las muestras de ADN deben dar siempre resultado positivo para alguno de los canales.
- Las muestras de ADN que generan un crossing point (Cp) >35 para HEX y/o para FAM deben ser consideradas como dudosas y deben ser retestadas realizando una nueva extracción del ADN.

16

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

# 11. Datos específicos de funcionamiento

## 1. Especificidad Analítica

El alineamiento de los primers y las sondas en las regiones 13.9kb y 22.0kb antes del codón de iniciación del gen *LCT*, es específico del polimorfismo presente. Tampoco se han reportado reacciones cruzadas con otras zonas de ADN genómico.

## 2. Sensibilidad Analítica

Una vez realizado un análisis de diluciones seriadas 1:4 de tres muestras de ADN, con genotipos CC y GG (normal), CT y GA (hetero) y por último TT y AA (homocigoto mutado), obtenidas mediante un sistema de extracción convencional, a una concentración inicial de 76,9 , 93,8 y 100,0 ng/μL respectivamente, se ha obtenido el siguiente dato en cuanto a sensibilidad analítica en la detección de los alelos CT13910 y GA22018:

- Muestra de ADN obtenido por sistema de extracción convencional:  
Límite de detección = 1,5 ng/μL (\*)

(\*)  $C_p < 35$

## 3. Sensibilidad y especificidad diagnóstica

En tres estudios de muestras de ADN genómico humano, realizados en dos laboratorios externos y en el laboratorio interno, se analizaron 151 muestras con un genotipo previo conocido obtenido mediante la metodología de PCR en tiempo real o de hibridación reversa.

De las 151 muestras analizadas, todas se pudieron validar (amplificación positiva). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Lactose Intolerance			
Reacción C13910T		Reacción G22018A	
CC	51	GG	48
CT	68	GA	73
TT	32	AA	30

Existe un 100% de concordancia de los resultados obtenidos con GENVINSET® LACTOSE INTOLERANCE y la información previa de las muestras genotipadas mediante PCR en tiempo real o hibridación reversa.

## 12. Limitaciones del procedimiento

- El presente kit permite la detección de los polimorfismos C13910T y G22018A del gen MCM6. La posible presencia de mutaciones en los lugares de hibridación de los primers y sondas puede dar lugar a la falta de definición de un alelo.
- Las condiciones descritas para la PCR deben ser controladas con precisión. Desviaciones de estos parámetros pueden llevar a resultados deficientes.
- Todos los procedimientos descritos en este protocolo deben efectuarse conforme a las buenas prácticas de laboratorio y ajustándose a las regulaciones locales.
- El termociclador qPCR debe estar calibrado según recomendaciones del fabricante y utilizarse respetando los límites especificados por éste.
- No deben mezclarse componentes de otros kits y/o lotes.
- No debe utilizarse el kit una vez vencida su fecha de caducidad.
- No utilizar el kit en caso de sospecha de pérdida de reactividad, contaminación, deterioro del envase o cualquier otra incidencia que pueda afectar al rendimiento del mismo.
- La interpretación de los datos y resultados del genotipado deben ser revisados por personal cualificado.
- Los reactivos caducados deben desecharse siguiendo la normativa aplicable.

## 13. Guía de solución de problemas

### El Reaction Blank (H<sub>2</sub>O) es positivo

- **Contaminación del Primer Mix/Master Mix/Reaction Blank**
  - Repita el experimento con nuevas alícuotas de Primer Mix/Master Mix/Reaction Blank
  - Manipule los componentes del kit siempre según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación
  - Verifique condiciones de almacenamiento y manipulación
  - Deseche reactivos contaminados
- **Contaminación presente en la zona pre-PCR**
  - Confirme que se han seguido las precauciones necesarias en la zona de PCR
  - Revise posibles problemas de contaminación en otras técnicas de PCR
  - Confirme la idoneidad del fungible utilizado (tubos 1.5 mL, puntas de pipetas)
- **Error de pipeteo**
  - Verifique que la muestra añadida en una posición dada corresponde siempre a la asignada en la hoja de trabajo

### Señal débil o ausente en todas las muestras. Muestras control (+/-) funcionan bien

- **Mala calidad de las muestras de ADN**
  - Repita la extracción de ADN verificando cada paso. La hemoglobina puede interferir con la PCR
- **Muestras con muy baja concentración de ADN**
  - Revise la concentración de ADN de las muestras
- **Muestras de ADN con elevada concentración**
  - Realizar una validación previa del sistema de extracción testando diluciones de la muestra

### Intensidad de fluorescencia demasiado baja

- **Degradación del kit (Vial de Primer Mix y/o Master Mix)**
  - Confirmar el correcto almacenamiento de los kits
  - Evitar más de 3 ciclos de congelación/descongelación del vial de Primer Mix

- Alicuotar los reactivos en caso necesario
- Repetir la tanda con reactivos nuevos

**Muestra de control C1 es positiva para FAM**

- **Contaminación cruzada**
  - Manipule los componentes del kit siempre según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación
- **Error de pipeteo**
  - Verifique que la muestra añadida en una posición dada corresponde siempre a la asignada en la hoja de trabajo

**Muestra de control C2 es positiva para HEX**

- **Contaminación cruzada**
  - Manipule los componentes del kit siempre según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación
- **Error de pipeteo**
  - Verifique que la muestra añadida en una posición dada corresponde siempre a la asignada en la hoja de trabajo

**Intensidad de fluorescencia varía**

- **Existe suciedad en la parte exterior del tubo que interfiere con la señal de lectura**
  - Manipule las placas siempre con guantes
- **El volumen no se encuentra en el fondo del pocillo o existe alguna burbuja de aire**
  - Realice una centrifugación para asegurar que todo el volumen se deposite en el fondo del pocillo y eliminar las burbujas de aire
- **Error de pipeteo**
  - Verifique que el volumen añadido en cada pocillo coincide con el correcto

**No hay señal de fluorescencia**

- **Selección de canales de lectura incorrectos**
  - Configure los canales de lectura correctos
- **Errores de pipeteo u omisión de reactivos**
  - Controle el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción
  - Repita la PCR

- No se ha seleccionado en el programa del termociclador ninguna lectura
  - Revise y modifique el programa del termociclador

## 14. Referencias

1. Deng Y, Misselwitz B, Dai N, Fox M. Lactose intolerance in adults: Biological mechanism and dietary management. *Nutrients*. 2015;7(9):8020–35.
2. Troelsen JT. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2005.
3. Rasinperä H, Kuokkanen M, Kolho KL, Lindahl H, Enattah NS, Savilahti E, et al. Transcriptional downregulation of the lactose (LCT) gene during childhood [3]. *Gut*. 2005.
4. Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol*. 1994;
5. Robayo-Torres CC, Nichols BL. Molecular differentiation of congenital lactase deficiency from adult-type hypolactasia. *Nutrition Reviews*. 2007.
6. Lomer MCE, Parkes GC, Sanderson JD. Review article: Lactose intolerance in clinical practice - Myths and realities. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2008.
7. Shaukat A, Levitt MD, Taylor BC, MacDonald R, Shamliyan TA, Kane RL, et al. Systematic review: Effective management strategies for lactose intolerance. In: *Annals of Internal Medicine*. 2010.
8. Mattar R, Mazo DF de C, Carrilho FJ. Lactose intolerance: Diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clin Exp Gastroenterol*. 2012;5(1):113–21.
9. Boll W, Wagner P, Mantei N. Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase-phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. *Am J Hum Genet*. 1991;
10. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet*. 2002;
11. Sun HM, Qiao YD, Chen F, Xu LD, Bai J, Fu S Bin. The lactase gene -13910T allele can not predict the lactase-persistence phenotype in north China. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007;
12. Mattar R, Monteiro M do S, da Silva JMK, Carrilho FJ. LCT-22018G>A single nucleotide polymorphism is a better predictor of adult-type hypolactasia/lactase persistence in Japanese-Brazilians than LCT-13910C>T. *Clinics*. 2010;65(12):1399–400.
13. Rasinperä H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Tötterman N, Lindahl H, et al. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut*. 2004;
14. Högenauer C, Hammer HF, Mellitzer K, Renner W, Krejs GJ, Toplak H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactose non-persistence. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005;

15. Bodlaj G, Stöcher M, Hufnagl P, Hubmann R, Biesenbach G, Stekel H, et al. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase - 13910 Polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. *Clin Chem.* 2006;
16. Mattar R, do Socorro Monteiro M, Villares CA, dos Santos AF, Carrilho FJ. Single nucleotide polymorphism C/T-13910, located upstream of the lactase gene, associated with adult-type hypolactasia: Validation for clinical practice. *Clin Biochem.* 2008;
17. Mulcare CA, Weale ME, Jones AL, Connell B, Zeitlyn D, Tarekegn A, et al. The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C - 13.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in africans. *Am J Hum Genet.* 2004;
18. Xu L, Sun H, Zhang X, Wang J, Sun D, Chen F, et al. The -22018A allele matches the lactase persistence phenotype in northern Chinese populations. *Scand J Gastroenterol.* 2010;
19. Ingram CJE, Elamin MF, Mulcare CA, Weale ME, Tarekegn A, Raga TO, et al. A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: Multiple causes for lactase persistence? *Hum Genet.* 2007;
20. Ingram CJE, Raga TO, Tarekegn A, Browning SL, Elamin MF, Bekele E, et al. Multiple rare variants as a cause of a common phenotype: Several different lactase persistence associated alleles in a single ethnic group. *J Mol Evol.* 2009;
21. Metz G, Peters TJ, Jenkins DJA, Newman A, Blendis LM. BREATH HYDROGEN AS A DIAGNOSTIC METHOD FOR HYPOLACTASIA. *Lancet.* 1975;
22. Maiuri L, Raia V, Potter J, Swallow D, Ho MW, Fiocca R, et al. Mosaic pattern of lactase expression by villous enterocytes in human adult-type hypolactasia. *Gastroenterology.* 1991;
23. Yang J, Deng Y, Chu H, Cong Y, Zhao J, Pohl D, et al. Prevalence and Presentation of Lactose Intolerance and Effects on Dairy Product Intake in Healthy Subjects and Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;

## 15. Aviso al comprador

- Este producto está concebido para uso en diagnóstico in vitro.
- Los productos de BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U. no deben ser revendidos, modificados para reventa ni utilizados para fabricar otros productos comerciales sin autorización por escrito 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. No concede ninguna patente general ni otra licencia de ningún tipo aparte de este derecho de uso específico por la compra.
- FAM™ y HEX™ son marcas comerciales de Life Technologies Corporation.
- VIC® es una marca registrada de Life Technologies Corporation.
- FAM™, HEX™ y VIC® podrían estar cubiertos por una o más de las patentes propiedad de Applied Biosystems, LLC. El precio de compra de este producto incluye derechos limitados, no transferibles.
- TaqMan® es una marca registrada de Roche Molecular Systems, Inc.
- GENVINSET® es una marca comercial de BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U.

## 16. Cambios respecto a la version 01

Versión	Descripción del cambio
Rev. 00	Primera versión
Rev. 01	Adición del logo CE y de la sección "Sensibilidad y especificidad diagnóstica"
Rev. 02	Adición del instrumento CFX96 de qPCR a la lista de termocicladores validados

## 17. Símbolos de las etiquetas



Uso diagnóstico in vitro



Producto que cumple con los requisitos de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro



Número de catálogo



Número de lote



Fecha de caducidad



Contenido suficiente para <n> ensayos



Fabricado por



Conservar a



Manténgase fuera de la luz del sol



Control positivo