

Instrucciones de Uso

“Kits” HISTO TYPE SSP

CE 0123

IVD

“Kits” de Pruebas para tipificación tisular de alelos HLA basado en genética molecular
(Clase I: HLA-A, B, C y Clase II: HLA-DR, DQ)

Listos para su uso, prealiquotados.

REF 70721	HISTO TYPE A low	REF 707211	HISTO TYPE A Happy Pack
REF 70731	HISTO TYPE B low	REF 707311	HISTO TYPE B Happy Pack
REF 70741	HISTO TYPE C low	REF 707411	HISTO TYPE C Happy Pack
REF 70751	HISTO TYPE DR low	REF 707511	HISTO TYPE DR Happy Pack
REF 70891	HISTO TYPE DQB low	REF 708911	HISTO TYPE DQB Happy Pack
REF 7098	HISTO TYPE ABDR	REF 709811	HISTO TYPE ABDR Happy Pack
REF 7102	HISTO TYPE ABC	REF 710211	HISTO TYPE ABC Happy Pack
REF 7103	HISTO TYPE DR/DQB	REF 710311	HISTO TYPE DR/DQB Happy Pack
REF 709010	HISTO TYPE DQB high	REF 709011	HISTO TYPE DQB high Happy Pack
REF 7070	HISTO TYPE B27 low	REF 707011	HISTO TYPE B27 (48) Happy Pack
REF 7071	HISTO TYPE B27 low	REF 707111	HISTO TYPE B27 (96) Happy Pack
REF 70941	HISTO TYPE Celiac Disease	REF 709411	HISTO TYPE Celiac Disease Happy Pack
REF 70715	HISTO TYPE B57	REF 707151	HISTO TYPE B57 Happy Pack
REF 70716	HISTO TYPE Narcolepsy	REF 707161	HISTO TYPE Narcolepsy Happy Pack

Los HISTO TYPE Happy Packs consisten en un “kit” HISTO TYPE y su Happy Taq.

Contenidos

1.	Descripción del Producto.....	2
1.1	Información breve del “kit” HISTO TYPE Celiac Disease	2
1.2	Información breve del “kit” HISTO TYPE B57	2
1.3	Información breve del “kit” HISTO TYPE Narcolepsy	2
1.4	Información breve del “kit” HISTO TYPE B27	2
2.	Material	3
2.1	Contenido de los “kits” HISTO TYPE SSP	3
2.2	Composición de los HISTO TYPE “Happy Packs”	3
2.3	Requerimientos y material adicional	4
2.4	Almacenamiento y estabilidad.....	4
3.	Datos de funcionamiento.....	4
4.	Procedimiento de la Prueba	5
4.1	Condiciones de Seguridad y Observaciones especiales	5
4.2	Extracción de ADN	5
4.3	Amplificación	5
4.4	Electroforesis en Gel	8
4.5	Fotodocumentation e Interpretación.....	8
5.	Avisos y Precauciones	9
6.	Solución de Problemas	9
7.	Bibliografía.....	10
8.	Explicación de los símbolos usados en las etiquetas	11

Versión: 12/2014 / Distribución: 2014-05

1. Descripción del Producto

El uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el tipaje HLA se ha convertido en rutinario. La secuenciación de alelos HLA [1] ha facilitado un tipado claro a nivel de ADN con alta resolución y con muchas ventajas sobre los métodos serológicos usados tradicionalmente.

El material básico para el tipaje con los “kits” **HISTO TYPE SSP** es ADN purificado. El procedimiento de la prueba está realizado usando la PCR con “Primers” Específicos de Secuencia (SSP), ver Figura 1 [2, 3]. Este método está basado en el hecho que la extensión del “primer” y por tanto la PCR exitosa depende de un ajuste perfecto en los extremos 3' de ambos “primers”. Por tanto, sólo si los “primers” ajustan completamente con la secuencia diana se obtendrá amplificación la cual se visualizará posteriormente usando electroforesis en gel de agarosa.

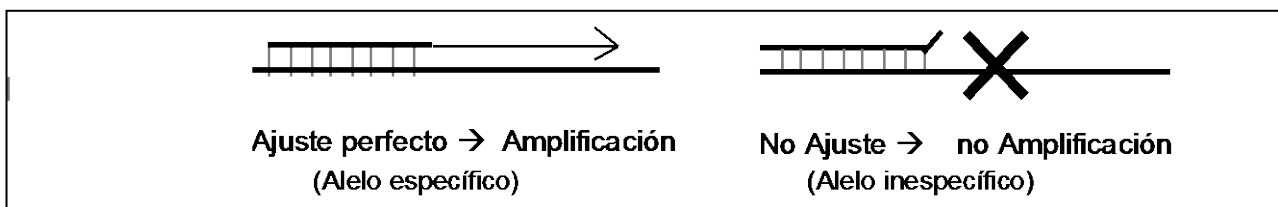


Fig. 1: Principio de una PCR-SSP

La composición de las mezclas individuales de “primers” proporciona una identificación clara de los tipos HLA posibles indicados en los diagramas de evaluación respectivos. Se usan un cierto número de “mixes” de reacción **prealiquotadas** y **secas** que incluyen un control interno de amplificación para un volumen final de 10 µl are used.

1.1 Información breve del “kit” HISTO TYPE Celiac Disease

La Enfermedad Celíaca es una reacción autoinmune provocada por el gluten que es un ingrediente de diferentes cereales. Si no se diagnostica pronto conduce a una inflamación crónica y destrucción del intestino delgado. La Enfermedad Celíaca está fuertemente asociada con los haplotipos DQA1*05:01-DQB1*02:01 y DQA1*03-DQB1*03:02. Además, los alelos DR3, DR7 y DR11 se pueden usar como marcadores genéticos. [8-10]

1.2 Información breve del “kit” HISTO TYPE 57

El tratamiento con fármacos antiretrovirales que contengan Abacavir como principio activo (p.ej. para terapia VIH) sólo está permitido, si se ha excluido la presencia del alelo HLA B*57:01 en el paciente. Esto se debe a una posible reacción de hipersensibilidad que está asociada con este alelo. [11-13]

1.3 Información breve del “kit” HISTO TYPE Narcolepsy

La Narcolepsia es un desorden del sueño con síntomas como excesiva somnolencia durante el día, parálisis del sueño o alucinaciones. El 98% de los pacientes Caucásicos con narcolepsia tienen el haplotipo DRB1*15:01 – DQA1*01:02 – DQB1*06:02. Por tanto, el Tipaje HLA Typing es muy útil para confirmar o excluir un diagnóstico. [14-16]

1.4 Información breve del “kit” HISTO TYPE B27

La asociación entre HLA-B27 y el grupo de enfermedades resumidas como artritis seronegativas (Enfermedad de Bechterew, Enfermedad de Reiter, Artritis reactiva) se usa frecuentemente como parte del procedimiento diagnóstico. Un resultado positivo para HLA-B27 está asociado con un riesgo muy alto de enfermedad (ver Tabla 1) [17,18]. De manera más notable, un resultado diagnóstico confirmado de HLA-B27 proporciona una

importante contribución a la terapia del paciente en casos poco claros de sospecha de Enfermedad de Bechterew.

Enfermedad	Frecuencia de B27 en pacientes	Riesgo relativo
Espondilitis Anquilosante (Enf. de Bechterew)	90.2 %	91
Enfermedad de Reiter	78.8 %	37.6
Artritis reactiva post-infección	70.2 %	

Tabla 1: HLA-B27, Frecuencias y riesgos.

2. Material

2.1 Contenido de los “kits” HISTO TYPE SSP

- ◆ Placas/tiras HISTO TYPE para el tipado HLA. Las mezclas prealiquotadas y secas están formadas por “primers” específicos de alelo, “primers” para el control interno (específicos para el gen humano de la G3PDH) y nucleótidos. La primera “mix” de reacción está marcada (ver distribución de “mixes” en la página 7). En algunos productos HISTO TYPE el control de contaminación se encuentra en la última posición de las placas (ver la tabla específica de lote adjunta y el diagrama de evaluación). El número de lote está impreso en cada placa/tira.
- ◆ Control de contaminación en tiras de PCR (de 8 tubos), con “primers” para el control interno y primers específicos de amplificación (no separadamente, si el control de contaminación está integrado en la última posición de la placa de pruebas y en el “kit” HISTO TYPE B27 low).
- ◆ Tampón de PCR 10x
- ◆ Tiras de tapones de PCR o lámina adhesiva para PCR
- ◆ Instrucciones de uso
- ◆ Tabla de Especificidades, diagrama de evaluación y hoja de trabajo (no en el “kit” HISTO TYPE B27 low)

2.2 Composición de los HISTO TYPE “Happy Packs”

- ◆ “Kit” HISTO TYPE (contenido en punto 2.1)
- ◆ Happy Taq (REF 70976) lista para usar, 50µl (250U/Vial), 5Unidades/µl, enzima recombinante, actividad exonucleasa 5' → 3'.

HISTO TYPE A Happy Pack:	1 x REF 70721,	1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE B Happy Pack:	1 x REF 70731,	2 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE C Happy Pack:	1 x REF 70741,	1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE DR Happy Pack:	1 x REF 70751,	1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE DQB Happy Pack:	1 x REF 70891,	1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE ABDR Happy Pack:	1 x REF 7098,	4 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE ABC Happy Pack:	1 x REF 7102,	4 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE DR/DQB Happy Pack:	1 x REF 7103,	2 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE DQB high Happy Pack:	1 x REF 709010,	2 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE B27 (48) Happy Pack:	1 x REF 7070,	1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE B27 (96) Happy Pack:	1 x REF 7071,	1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE Celiac Disease Happy Pack:	1 x REF 70941,	1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE B57 Happy Pack:	1 x REF 70715,	1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE Narcolepsy Happy Pack:	1 x REF 70716,	1 x Happy Taq REF 70976

2.3 Requerimientos y material adicional

- ◆ “Kit” Happy Taq (REF 70977) (u otra Taq Polimerasa, validada por el usuario con los “kits” HISTO TYPE). Sólo necesaria para los “kits” HISTO TYPE.
Los HISTO TYPE Happy Packs se enviarán con la cantidad necesaria de Happy Taq (consultar 2.2)
- !!! **No usar una Taq Polimerasa “Hot-start”, por favor !!!**
- ◆ “Kit” **BAG EXTRA-GENE I** (REF 7059) para la extracción de ADN de sangre, linfocitos, leucocitos o material para otros métodos de extracción de ADN.
- ◆ Pipetas automáticas (0,5-250 µl)
- ◆ Puntas estériles con filtro integrado
- ◆ Termociclador para ADN (listado de los termocicladores validados en la página 7)

Dispositivos y materiales para electroforesis en gel

- ◆ Agarosa para ADN
- ◆ 0,5x tampón TBE (45 mM de Tris base, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA)
- ◆ Bromuro de Etidio (EtBr)
- ◆ Unidad de electroforesis
- ◆ Fuente de Alimentación (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ Estándar de longitudes de ADN (DNA-length standard REF 7097)

Dispositivos para interpretación y fotodocumentación

- ◆ Fuente UV (220 - 310 nm)
- ◆ Cámara (p.ej.: sistema Polaroid) con película (Polaroid tipo 667) o sistema de vídeo con papel térmico (p.ej.: Typ KP65HM-CE)
- ◆ Posiblemente un PC y el software para interpretación HISTO MATCH (BAG Health Care) o SCORE (versión completa)

2.4. Almacenamiento y estabilidad

Los “kits” HISTO TYPE se entregan a temperatura ambiente. Tras recibirlos, almacenar todos los reactivos a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ o $2 - 8^{\circ}\text{C}$, en oscuridad y en dispositivos con temperatura monitorizada (**¡Evitar cambios frecuentes de temperatura de almacenamiento!**). En caso de los HISTO TYPE Happy Packs, los “kits” HISTO TYPE se enviarán a temperatura ambiente y la Happy Taq con hielo seco. Tras recibirlos, almacenar todos los reactivos a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ o $2 - 8^{\circ}\text{C}$, en oscuridad y la Happy Taq a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ en dispositivos con temperatura monitorizada (**¡Evitar cambios frecuentes de temperatura de almacenamiento!**). La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta de cada reactivo y es válida también para reactivos una vez abiertos. La fecha de caducidad indicada en la etiqueta exterior hace referencia al reactivo con la estabilidad más corta contenido en el “kit”.

3. Datos de funcionamiento

La composición de la mezcla de “primers” garantiza una identificación fiable de los tipos HLA (basados en los últimos datos de secuencia) indicados en el diagrama de evaluación. Se realizarán actualizaciones con regularidad.

La precisión y reproducibilidad de la especificidad de cada mezcla de “primers” son verificadas para cada lote con muestras pretipadas de referencia. Algunas mezclas podrían no estar probadas para una reacción positiva porque son específicas de alelos raros que no están disponibles para probarlos. Esto está indicado en el diagrama de evaluación o en la tabla de especificidades.

Se realizó un estudio para todos los “kits” HISTO TYPE SSP con al menos 30 muestras de ADN. No se encontraron discrepancias con los resultados obtenidos en pruebas anteriores realizadas con otros métodos o con “kits” SSP de otro fabricante.

La evaluación y el control de calidad de las mezclas se realiza con muestras de ADN, que se extraen con EXTRA GENE I (método salino) o “kits” Qiagen (método basado en columnas). Los “kits” HISTO TYPE están validados con la Happy Taq (REF 70976) o con la Taq Polimerasa de un “kit” Happy Taq (REF 70977). Usando otra Taq Polimerasa, la enzima debe ser validada para los “kits” HISTO TYPE por el usuario.

Se puede garantizar un tipado fiable si se usan de 25-50ng de ADN por “mix” de reacción.

4. Procedimiento de la Prueba

4.1 Condiciones de Seguridad y Observaciones especiales

La PCR es un método particularmente sensible y deben ser realizadas por personal capacitado, con experiencia en técnicas de genética molecular y pruebas de histocompatibilidad. Se deben seguir las directrices de trasplante, así como las normas EFI a fin de reducir al mínimo el riesgo de falsa tipificación, particularmente en el caso de discrepancias entre los métodos serológicos y de genética molecular.

Se deben tener condiciones especiales de seguridad para evitar contaminación y, por tanto, falsas reacciones:

- Use guantes durante el trabajo (sin polvo, si es posible).
- Utilizar puntas nuevas en cada paso de pipeteo (con filtro integrado).
- Utilizar áreas de trabajo diferentes para la preamplificación (purificación de ADN y preparación de las reacciones) y postamplificación (electroforesis en gel y documentación). Preferiblemente utilice dos habitaciones separadas.
- Utilizar los dispositivos y otros materiales sólo en los lugares respectivos y no intercambiarlos.

4.2 Extracción de ADN

El “kit” **BAG EXTRA-GENE I** es el más adecuado para la extracción de ADN dado que se puede obtener AND purificado de sangre total en poco tiempo sin usar químicos tóxicos o disolventes. Además métodos comerciales basados en columnas o partículas magnéticas u otros métodos descritos en la literatura son también adecuados para obtener ADN con suficiente pureza. La heparina potencialmente inhibe la PCR [6]. Por lo que se recomienda el uso de sangre EDTA o Citrato para tipificación.

El ADN debería tener los siguientes índices de pureza:

- $DO_{260}/DO_{280} = >1.5$ y <2.0 (indicador de contaminación con ARN/proteínas)
- $DO_{260}/DO_{230} = >1.8$ (indicator de contaminación con sales, carbohidratos o solventes orgánicos)

4.3 Amplificación

Todas las mezclas de reacción prealiquotadas ya contienen “primers” específicos de alelos y controles y nucleótidos. Estos se suministran secos en el fondo del tubo de reacción. Los parámetros de amplificación están optimizados para un volumen final de 10µl.

1. Coger del “kit” el número de placas o tiras HISTO TYPE HLA-SSP requeridas y el tampón de PCR 10x.

2. Pipetear la Master-Mix formada por tampón de PCR 10x, solución de ADN, Taq-Polimerasa y H₂O destilada y mezclar bien. Los diferentes “kits” HISTO TYPE SSP funcionan con la misma Master-Mix y por lo tanto se pueden combinar. La composición de la Master-Mix dependiendo del número de mezclas de reacción se muestra en la Tabla 1 (ver abajo).

En el caso de **HISTO TYPE B27** se recomienda preparar una **solución Taq-tampón-H₂O**:

0.08 µl	Taq polimerasa (5 U/µl)	x N° determinaciones + 1
1.0 µl	10x tampón de PCR	x N° determinaciones + 1
7.0 µl	H ₂ O	x N° determinaciones + 1

Mezclar la solución completamente y añadir **8,0 µl** de la misma a cada tobo de reacción.

Después añadir **2.0 µl de ADN** (12,5-25 ng/µl) en el vial de reacción respectivo.

Si se debe realizar un **control de contaminación**, preparar la Master-Mix sin ADN primero y pipetear 10µl de esta mezcla en el control de contaminación (color azul). Después añadir el ADN y distribuir la Master-Mix en las mezclas de reacción precargadas.

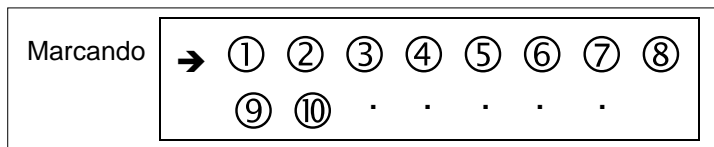
Tabla 1: Composición de la Master-Mix dependiendo del N° de mezclas de reacción

N° de mezclas	Agua dest.	Tampón de PCR 10x	Solución-ADN (25-50 ng/µl)	Happy-Taq (5 U/µl)	Volumen total
1	8	1	1	0.08	10 µl
4	63	8	8	0.6	80 µl
8	79	10	10	0.8	100 µl
24	222	28	28	2.2	280 µl
30	269	34	34	2.7	340 µl
32	285	36	36	2.9	360 µl
48	412	52	52	4.2	520 µl
54	459	58	58	4.6	580 µl
56	475	60	60	4.8	600 µl
72	618	78	78	6.2	780 µl
80	681	86	86	6.9	860 µl
96	808	102	102	8.2	1020 µl

⇒ La cantidad de ADN por mezcla debería ser 25 – 50ng. Según la concentración de ADN, la cantidad de ADN y agua se tiene que ajustar (p.ej.: para 24 mezclas: 14µl ADN (100 ng/µl) y 236µl de Agua destilada).

⇒ Si se usase otra Taq Polimerasa, la enzima debe ser validada para los “kits” HISTO TYPE por el usuario.

- 3.: Tras agitar en el vortex, añadir **10 µl** de esta mezcla inmediatamente a las mezclas precargadas y secas. Cambiar de punta tras cada paso de pipeteo. Cerrar los tubos fuerte con sus respectivos tapones o con una lámina adhesiva. Asegurarse de no tocar con los dedos la parte interior de los tapones o los bordes superiores de los tubos para evitar contaminaciones. Si se usan termocicladores con tapa de ajuste fuerte, también es posible usar alfombrillas de PCR reutilizables.



Agitar ligeramente la placa/tira para disolver el pellet del fondo del tubo. Toda la solución de PCR debe quedarse en el fondo. Si fuera necesario la placa/tira debería ser centrifugada un instante.

- 4.: Colocar los tubos de reacción con firmeza en el termociclador y apretar bien la tapa. Iniciar el programa de PCR. ¡¡**No** es necesario recubrir las mezclas de reacción con aceite mineral si se usa una tapa caliente y ajustada!!

Parámetros de Amplificación

Programa-Paso	Temp.	Tiempo	Nº de Ciclos
Desnat. Inicial	96°C	5 Min	1 Ciclo
Desnaturalización	96°C	20 Seg	5 Ciclos
Anillamiento+Extensión	68°C	1 Min	
Desnaturalización	96°C	20 Seg	10 Ciclos
Anillamiento	64°C	50 Seg	
Extensión	72°C	45 Seg	
Desnaturalización	96°C	20 Seg	15 Ciclos
Anillamiento	61°C	50 Seg	
Extensión	72°C	45 Seg	
Final Extension	72°C	5 Min	1 Ciclo

Termocicladores Validados:

PTC 100 / 200 / C1000
(MJ Research/ BioRad),
GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (usar tasa de calentamiento del 9600) (ABI),
Mastercycler epGradient S (usar la función "simular gradiente de Mastercycler")
(Eppendorf),
Tprofessional (Biometra)

¡¡ **No usar bloques térmicos de aluminio (p.ej.: GeneAmp PCR-System 9600 / 9700) !!**

Cuando se usen termocicladores con tasas muy rápidas de calentamiento y enfriamiento, se recomienda usar una rampa térmica reducida (~ 2.5°C/seg).

Dado que los termocicladores de diferentes fabricantes rinden de manera distinta e incluso máquinas individuales de un tipo pueden estar calibradas diferentemente, puede ser necesario optimizar los parámetros de amplificación. Si se usan otros modelos distintos a los termocicladores validados mencionados arriba tienen que ser validados por el usuario.

Para optimizar un termociclador usar la siguiente guía:

Si hay reacciones **falsas positivas** (bandas inespecíficas, tipos adicionales), aumentar la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C.

Si hay reacciones **falsas negativas** (bandas desaparecidas), disminuir la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C y/o aumentar los tiempos de anillamiento en pasos de 5 segundos y/o aumentar los tiempos de desnaturalización en pasos de 5 segundos.

Se recomienda usar exclusivamente termocicladores calibrados con regularidad. El “kit” BAG-CYCLER CHECK (REF 7104) es muy adecuado para este fin.

Las pruebas de Control de Calidad se llevaron a cabo en un PTC-200 resp. C1000 (MJ Research / BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) y Tprofessional (Biometra).

4.4 Electroforesis en Gel

La separación de los productos de amplificación se realiza usando un gel (horizontal) de agarosa. Como tampón para la electroforesis, se recomienda TBE 0,5x (45 mM de tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA). La concentración del gel debe ser del 2,0 – 2,5% de agarosa. Dejar polimerizar el gel al menos 30 minutos antes de cargar las muestras. Al terminar la amplificación, sacar las muestras del termociclador y cargar cuidadosamente todas las muestras de reacción completas en cada pocillo del gel. Además, aplicar 10µl de un estándar de longitud de ADN para comparar los tamaños. La separación electroforética se hace a 10 - 12 V/cm (con una distancia de unos 20 cm entre los electrodos, aprox. 200 - 240V), durante 20 - 40 minutos. Tras finalizar, se tiñe el gel completo en una solución de Bromuro de Etidio (EtBr) (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr en H₂O o tampón TBE) durante 30 - 40 minutos. Como alternativa, el EtBr (0,5 µg/ml) se puede añadir al tampón de electroforesis o al gel de agarose. Si fuese necesario, se puede eliminar el exceso de EtBr empapando el gel en H₂O o en tampón TBE 0,5x durante 20 - 30 minutos.

4.5 Fotodocumentación e Interpretación

Para fotodocumentación, visualizar el amplificado de la PCR usando un transiluminador UV (220 - 310nm) y fotografiarlo con una cámara adecuada, película y filtros (p.ej.: Polaroid, película tipo 667 o sistema de vídeo, y papel térmico KP65HM-CE). Elegir el tiempo de exposición y la apertura de tal manera que las bandas se vean nítidas y destaquen frente al fondo oscuro (apertura aproximada 11, tiempo de exposición 1 segundo).

Para la interpretación, usar la tabla específica y el diagrama de evaluación (ver hoja extra); sólo se deben considerar positivas las bandas que tengan el tamaño correcto en comparación con el estándar de longitud de ADN.

En HISTO TYPE B27, las bandas específicas tienen una longitud de 420bp y/o 85bp.

En el caso de otros productos HISTO TYPE los tamaños correctos están indicados en la tabla y diagrama correspondientes. En todas las calles sin amplificación específica de alelo, se debe ver una banda de **1070bp** del control interno (**en HISTO TYPE Celiac Disease 1070bp / 429bp**). ¡En la mayoría de los casos con una amplificación específica de alelo la banda del control interno es más débil o incluso desaparece completamente! Para resultados inapropiados ver resolución de problemas (punto 6).

En el **control de contaminación** no debe verse ninguna banda. Si hubiese una contaminación con ADN genómico saldrá una banda de 282bp. Pueden aparecer bandas adicionales de 78bp, 104bp, 176bp y sobre 580bp. Si hay una contaminación con amplificados las bandas pueden aparecer en 78bp y/o 104bp y/o 176bp y/o 282bp y/o 580bp.

Se recomienda encarecidamente el uso del software HISTO MATCH (BAG Health Care) o SCORE (versión completa) para la evaluación. Los ficheros para la evaluación están disponibles en el servidor de descargas (<http://service.bag-healthcare.com>) o a través de nuestro servicio al cliente (teléfono: +49 (0) 6404-925-125) o en su distribuidor local.

5. Avisos y Precauciones

El Bromuro de Etidio es una sustancia mutagénica potente. ¡Usar guantes cuando se manejen geles o soluciones que contengan EtBr! ¡Tenga en cuenta las instrucciones de uso, avisos y precauciones del fabricante! El transiluminador emite ondas muy cortas de luz UV que puede causar quemaduras en piel y retina. ¡Usar una máscara de seguridad!

El material biológico que se utiliza para la extracción de ADN, p. ej., sangre o tejidos humanos, se deben tratar como potencialmente infecciosos. Cuando se manipula material biológico se recomienda observar las debidas medidas de seguridad (no pipetear con la boca; usar guantes desechables durante la manipulación material biológico y la realización de la prueba; desinfectar las manos cuando haya terminado la prueba).

El material biológico se debe desactivar antes de desechar (por ejemplo en un autoclave). Los materiales desechables se deben esterilizar o incinerar después de utilizarlos.

Los derrames de materiales potencialmente infecciosos se deben eliminar inmediatamente con papel absorbente y limpiar las zonas contaminadas con un desinfectante estándar adecuado o de alcohol al 70%. Los materiales que se usan para limpiar derrames, incluyendo guantes, se deben desactivar antes de desecharlos (p. ej. en una autoclave).

6. Solución de Problemas





Problema	Posible causa	Solución
no amplificación, estándar de longitud visible	ADN contaminado con inhibidores de PCR	Repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos
	Concentración de ADN demasiado alta/demasiado baja	Cambiar concentración del ADN, repetir extracción de ADN
	No hay enzima o concentración demasiado baja	Repetir tipaje, cambiar concentración del ADN
	ADN de sangre heparinizada	Repetir tipaje con sangre EDTA o citrato
	Parámetros de amplificación incorrectos	optimizar los parametros de amplificación (ver 4.3) ☆
fallo repetitivo en calles aisladas (no control de amplificación)	Agujero en los tubos de reacción; pérdida de agua y cambio de concentración durante la PCR	cerrar fuerte los tubos con los tapones; usar otros tubos de reacción
amplificación inespecífica, bandas adicionales, (bandas adicionales de tamaño incorrecto deben ser olvidadas)	contaminación con productos de amplificación	Repetir tipaje, asegurar funcionamiento exacto
	ADN contaminado con sales	Repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos
	Concentración de ADN demasiado alta	usar menos ADN
	Concentración de enzima demasiado alta	usar menos enzima
	Parámetros de amplificación incorrectos	optimizar los parametros de amplificación (ver 4.3) ☆
La evaluación muestra más de 2 especificidades	Contaminación por arrastre (productos de amplificación!) Nuevo alelo	comprobar mezclas de tipado (ADN no añadido) asegurar funcionamiento exacto
Ninguna o sólo bandas débiles visibles, estándar de longitud invisible	tinción con EtBr demasiado débil	repetir teñido
el fondo del gel tiene demasiado brillo	la tinción fue duró demasido, concentración de EtBr demasiado alta	sumergir el gel en H ₂ O o TBE disminuir la concentración de EtBr
bandas borrosas	tampón de electroforesis demasiado caliente o agotado, tampón de electroforesis incorrecto, mala polimerización del gel	disminuir el voltaje usar tampón TBE 0,5x

☆ Cuando se usan equipamientos y materiales listados, la optimización de los parámetros de amplificación se debería buscar sólo como un último recurso. En la mayoría de los casos, es posible evaluar la prueba eliminando las bandas adicionales causadas por discrepancia en el tamaño.

7. Bibliografía

1. Bodmer, J., 1993. Immunogenetics **37**:79-94
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
5. Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166
7. Bunce, M., 1995. Tissue Antigens **46**:355-367
8. Sacchetti et al., 1997. Clin Chem **43**:2204-2206
9. Edwin Liu et al., 2005. Gastroenterology **128**:33.37
10. Husby et al., 2012. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition **54**:136-160
11. Deutsches Ärzteblatt vom 10.03.2008
12. Mallal et al., Lancet 2002; 359: 727-732
13. Mallal et al., New England Journal of Medicine 2008; 358: 568-579
14. Nishino, S. et al., 2000. Sleep Medicine Reviews **4**:75-99
15. Mignot, E. et al., 2001. Am. J. Hum. Genet. **68**:686-699
16. Overeem, S. et al. 2008. Sleep Medicine Reviews **12**:95-107
17. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet **i**:904-907
18. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706

8. Explicación de los símbolos usados en las etiquetas

	Temperatura de almacenamiento
	Usar antes de
	Consultar las Instrucciones de uso
	Suficiente para "n" pruebas
CONT	Contenido, contiene
CONTROL CC	Control de Contaminación
HLA TYPING	Finalidad: Tipaje HLA
IFU	Instrucciones de uso
IVD	Para uso en Diagnóstico in vitro
LOT	Código de Sublote
OR	ó
PCRBUF 10x	Tampón de PCR, concentrado 10x
PCRCAP	Tapones de PCR
PCRFOIL	Láminas de PCR
PCRPLATE	Placas de PCR
PCRSTRIP	Tiras de PCR
REACTIONMIX	Mezclas de Reacción
REF	Referencia
RTU	Listo para usar
TAQ POLYMERASE	Taq-Polimerasa
WORKSHEET	Hoja de Trabajo

Instrucciones de uso en otros idiomas, consultar:

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

Teléfono: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH
 Amtsgerichtsstraße 1-5
 35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 0
 Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 250

www.bag-healthcare.com
 info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
 Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 450
 Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 460
 verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
 Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 125
 Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 421
 service@bag-healthcare.com