

Instrucciones de uso

“Kits” HISTO SPOT[®] SSO

Kits de ensayo para tipificación tisular de alelos HLA sobre una base genético-molecular

IVD

CE₀₁₂₃

REF 726010: HISTO SPOT [®] A 4D (96 det.)
REF 726020: HISTO SPOT [®] B 4D (96 det.)
REF 726030: HISTO SPOT [®] C 4D (96 det.)
REF 726040: HISTO SPOT [®] DRB1 4D (96 det.)
REF 726045: HISTO SPOT [®] DRB3/4/5 (24 det.)
REF 726050: HISTO SPOT [®] DQB1 4D (96 det.)
REF 726051: HISTO SPOT [®] DQB1 4D / DQA1 (96 det.)
REF 726060: HISTO SPOT [®] DPB1 (96 det.)
REF 726061: HISTO SPOT [®] DPB1 (24 det.)
REF 726098: HISTO SPOT [®] Reagent Kit

Versión: 11 / 2013

Envío: 2013-11

Contenido

1.	DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	2
2.	PRINCIPIO DE LA PRUEBA	2
3.	MATERIAL	3
3.1.	Reactivos suministrados con los kits de tipificación locus-específicos HISTO SPOT [®]	3
3.2.	Reactivos proporcionados con el HISTO SPOT [®] Reagent kit.	3
3.3.	Reactivos y equipamientos necesarios, pero no proporcionados.....	3
4.	ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD	4
5.	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	4
5.1.	Condiciones de seguridad y observaciones especiales	4
5.2.	Purificación de ADN	4
5.3.	Amplificación	5
5.4.	Ensayo de hibridación automatizado en el procesador MR.SPOT [®]	6
5.4.1.	Preparación de reactivos	6
5.4.2.	Configuración del procesador MR.SPOT [®]	7
5.4.3.	Transferencia de resultados a un PC para la interpretación	7
5.4.4.	Interpretación de los resultados.....	7
6.	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.....	8
7.	CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMIENTO	8
7.1.	Evaluación.....	8
7.2.	Reacción de amplificación PCR.....	9
7.3.	Resolución del ensayo.....	9
8.	LIMITACIONES DEL MÉTODO.....	9
9.	CONTROL DE CALIDAD INTERNO	9
10.	SOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	10
11.	MARCAS COMERCIALES UTILIZADAS EN ESTE DOCUMENTO/PRODUCTO	10
12.	EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL ETIQUETADO	11

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El sistema HISTO SPOT® SSO es un ensayo diagnóstico in vitro para la tipificación tisular de alelos HLA sobre una base genético molecular y proporciona resultados de tipificación de baja a media resolución. Este consta del kit de tipificación HISTO SPOT®, el kit de reactivo HISTO SPOT®, el procesador MR.SPOT® y el software de interpretación HISTO MATCH.

El kit de tipificación HISTO SPOT® contienen todos los componentes necesarios para la reacción de PCR y los pocillos de ensayo con sondas de oligonucleótido específico de secuencias inmovilizadas, para la detección de los productos de PCR. El kit de reactivo HISTO SPOT® contiene los reactivos para la hibridación y detección y puede utilizarse en combinación con todos los kits de tipificación HISTO SPOT®. El procesador MR.SPOT® está diseñado específicamente para utilizarse con los kits HISTO SPOT® con el fin de procesar entre 1 y 96 muestras, automatizar el proceso de hibridación, detección e interpretación de los resultados. Para interpretar los resultados se requiere el software HISTO MATCH.

2. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba incluye cuatro pasos básicos:

- Aislamiento de ADN
- Amplificación por PCR
- Hibridación y detección
- Interpretación de los datos

Se purifica el ADN a partir de la muestra clínica, utilizando el método de purificación de ADN establecido en el laboratorio o mediante kits comerciales. A continuación, el ADN se amplifica en una reacción de PCR locus específica utilizando el Master Mix y la solución de MgCl₂ que se proporcionan con el kit. La especificidad de la amplificación se rige por un conjunto de cebadores biotinilados que se han diseñado para amplificar de manera exclusiva los locus de HLA escogidos. Después del proceso de amplificación PCR, la placa de PCR conteniendo los amplicones marcados con biotina se transfiere al procesador MR.SPOT®. MR.SPOT® añade tampón de hibridación a cada pocillo y transfiere cada amplicón más el tampón de hibridación a un pocillo de ensayo que contiene una matriz de sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) inmovilizados. Estas sondas son lo mismo una sonda de un único oligonucleótido o una combinación de 2 o más sondas individuales, inmovilizadas en el mismo "spot" (mosaico de sondas) se han diseñado para mejorar la identificación de polimorfismos localizados en cis.

El amplicón marcado con biotina se une a aquellas sondas SSO que contienen una secuencia diana complementaria y, a continuación, se puede detectar por medio de una reacción colorimétrica. Con el fin de prevenir la unión no específica del amplicón en la superficie de los pocillos de ensayo MR.SPOT® bloquea los pocillos con un tampón de bloqueo antes de transferir el amplicón.

Después de un paso de lavado astringente para eliminar los amplicones no unidos, se añade a los pocillos un conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina que se une al amplicón marcado con biotina capturado por la sonda SSO. Tras otros pasos de lavado, se añade el sustrato BCIP/NBT que produce un color azul-violeta cuando es transformado por la fosfatasa alcalina. Los puntos de color que se forman en el fondo de los pocillos son fotografiados por MR.SPOT® y la imagen se transfiere al software HISTO MATCH instalado en el PC del usuario. El programa de análisis de imagen del software HISTO MATCH determina la intensidad de cada "spot" de la matriz y la compara con la intensidad del fondo. A partir de estos datos se calculan las reacciones positivas y negativas. El programa de coincidencia de patrones del software HISTO MATCH determina el tipo de HLA de la muestra basado en el patrón de hibridación específica.

3. MATERIAL

3.1. Reactivos suministrados con los kits de tipificación locus-específicos HISTO SPOT®

Testwells I X **Pocillos de ensayo**, envasados individualmente, cada tira que contiene 8 pruebas, posee inmovilizadas sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia

Mastermix I X **Master mix**, listo para usar, contiene cebadores biotinilados para el locus escogido, dNTPs, Taq polimerasa, tampón de reacción y azida sódica al 0,05%.

MgCl₂ **Cloruro de magnesio**, 6 mM, listo para usar, contiene 0,001% de Proclin® 300

X = A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQB1, DQ o DPB1

Con cada kit viene un CD que contiene el archivo de proceso por lotes que se tiene que almacenar dentro de la base de datos del software de interpretación HISTO MATCH (para más detalles, véase: Instrucciones de uso de HISTO MATCH) . Para cada kit hay lotes y sublotos:

- **Kit:** p. ej. el HISTO SPOT® A, define el locus probado
- **Lote:** p. ej., A084, A085, define el diseño y la especificidad de las sondas que vienen en el kit. Un único lote puede contener muchos sublotos diferentes.
- **Sublote:** p. ej., A085-1, A085-2, A085-3, define cómo reacciona una sonda en comparación con las sondas de control (valores del punto de corte), y define la fecha de producción y caducidad de las tiras. Sondas concretas pueden estar desactivadas in algunos sublotos del mismo lote. Esta información se encuentra en el CD específico de lote que viene con los kits (Tabla de dianas – Fichero Excel).

3.2. Reactivos proporcionados con el HISTO SPOT® Reagent kit.

Los reactivos incluidos en un kit son suficientes para 96 pruebas. Cada “kit” de reactivos contiene:

BLOCKBUF **tampón de bloqueo**, listo para usar, contiene 0,001% de Proclin® 150

HYBBUF **tampón de hibridación**, listo para usar, contiene 0.001% de colorante, 0,1% de dodecilsulfato sódico y 0,001% de Proclin® 150

STRGWASH **Tampón de lavado astringente**, listo para usar, contiene 0.001% de colorante, 0,1% de dodecilsulfato sódico y 0,001% de Proclin® 150

TBSWASH **Tampón de lavado TBS** (Tampón salino con Tris), listas para usar contiene 20mM de Tris, 0,003% de colorante y 0,001% Proclin® 150

SUBS **BCIP® / NBT sustrato**, listo para usar (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato / cloruro de nitroblue tetrazolium)

CONJ **Conjugado**, fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, concentrado contiene < 0,1% azida de sodio (que se diluye 1:1666 en tampón de bloqueo)

3.3. Reactivos y equipamientos necesarios, pero no proporcionados

- Procesador MR.SPOT®, incluyendo el software HISTO MATCH, [REF](#) 726100
- Puntas de pipetas para el procesador MR.SPOT®, 1000 µl [REF](#) 726099 y 200 µl [REF](#) 726097
- Reactivo de extracción de ADN (no utilizar el método salino)
- Placas PCR con faldilla, con tapas o película adhesiva (HISTO SPOT® PCR Frameplates [REF](#) 726220, tapones para PCR HISTO SPOT® [REF](#) 726090, láminas para PCR HISTO SPOT® [REF](#) 726089)
- Termociclador
- Agua desionizada
- Pipetas automáticas (0,5 - 1000 µl) y puntas desechables

4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos y componentes de los kits se deben almacenar entre 2 - 8°C. La fecha de caducidad viene indicada en la etiqueta de cada reactivo y es válida para los reactivos sellados. La fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja exterior se refiere al reactivo del kit con menor estabilidad. Se pueden abrir las tiras de 8 pocillos, separar los pocillos necesarios para el ensayo y los que no se utilicen se devuelven a guardar en la bolsa para utilizarse con el kit en el futuro. Los pocillos conservados en una bolsa ya abierta, se deben utilizar durante los siguientes 30 días. Los otros reactivos una vez abiertos se deben utilizar dentro de un período de 3 meses. El conjugado diluido se debe preparar fresco cada vez que se realice una prueba.

5. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

5.1. Condiciones de seguridad y observaciones especiales

Las técnicas de genética molecular son métodos particularmente sensibles y deben ser realizadas por personal capacitado, con experiencia en técnicas de genética molecular y pruebas de histocompatibilidad. Los resultados de estas pruebas no se deben utilizar como el único factor determinante para tomar decisiones clínicas.

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).
- Utilice áreas de trabajo diferentes para la preamplificación (purificación de ADN y preparación de las reacciones) y postamplificación (hibridación y detección). Preferiblemente utilice dos habitaciones separadas.
- El amplicón no debe llevarse al área de realización del PCR.
- Utilice dispositivos y otros materiales sólo en los lugares respectivos y no cambiarlos.

5.2. Purificación de ADN

Preparar el ADN de la muestra según el método estándar del laboratorio para la purificación de ADN para PCR (preferiblemente un método no salino).

Métodos de extracción de ADN validados:

- Columnas de QIAGEN

Métodos probados satisfactoriamente sobre el terreno:

- EZ-1 / Geno M6 (QIAGEN bolas magnéticas)
- Promega Maxwell 16
- QuatroProbe (BeeRobotics)

La heparina potencialmente inhibe la PCR. Por lo tanto, para el tipado se recomienda muestras de sangre en EDTA o citrato. La muestra de ADN debe tener una concentración de 15-30 ng/µl.

Los índices de pureza deben ser los siguientes:

- coeficiente de extinción OD_{260}/OD_{280} : $>1,5$ y $<2,0$.
Valores más altos indican la existencia de ARN, y valores más bajos significan contaminación con proteínas.
- coeficiente de extinción OD_{260}/OD_{230} : $>1,8$.

Valores más bajos indican una posible contaminación con carbohidratos, sales o solventes orgánicos.

5.3. Amplificación

Para la amplificación utilice placas de PCR con faldilla, porque el procesador MR.SPOT® utiliza esos rebordes para fijar la placa. Las placas de PCR HISTO SPOT® se han validado para esta aplicación, cualquier otra placa de otros proveedores tienen que ser validados por el usuario. A cada muestras a amplificar agregar al tubo de PCR los siguientes reactivos:

- 10 µl de Master Mix
- 5 µl de MgCl₂
- 5 µl de muestra de ADN (15-30 ng/µl)

El volumen total de cada reacción de amplificación es de 20 µl.

<u>Mezcla previa para varias muestras:</u>	nº de muestras+2	x 10 µl de Master mix	} Utilizar 15 µl de mezcla previa por muestra
	nº de muestras+2	x 5 µl MgCl ₂	

Nota: Es importante que la concentración del ADN este en el rango de 15 a 30 ng/µl. Concentraciones más altas puede provocar falsos positivos en las reacciones de las sondas y concentraciones más bajas pueden causar fallos de amplificación.

Si se debe incluir un **control negativo**, preparar una reacción de PCR con agua destilada en vez de muestra de ADN.

Sellar los tubos de amplificación con tapones o película adhesiva y centrifugar brevemente para llevar el líquido al fondo de los tubos. Colocar los tubos en el termociclador y amplificar bajo las siguientes condiciones:

Paso del programa	Tiempo	Temperatura	Nº de ciclos
Primera desnaturalización	2 Min	96°C	1 Ciclo
Desnaturalización	15 Seg.	96°C	10 Ciclos
Anillamiento + extensión	60 Seg.	65°C	
Desnaturalización	10 Seg.	96°C	20 Ciclos
Anillamiento	50 Seg.	61°C	
Extensión	30 Seg.	72°C	
Mantener	∞	22°C	

Las condiciones son las mismas para todos los termocicladores sin embargo el tiempo total necesario para esta etapa variará según la velocidad de rampa específica del termociclador.

Los siguientes modelos de termociclador se han validado con HISTO SPOT® SSO:

Applied Biosystems: PE 9600, PE 9700 (usando la velocidad de rampa del PE 9700), Veriti™
 Biorad: PTC 100 / 200 PTC, Mycycler
 Eppendorf: Mastercycler EP Gradient S

Si se utilizan otros termocicladores, el usuario deberá hacer la validación. Se recomienda como norma general usar una velocidad de rampa de 1 – 2°C/seg.

Una vez completado el paso de amplificación, las muestras se pueden analizar inmediatamente o almacenarlas entre 2 - 8°C hasta 5 días.

5.4. Ensayo de hibridación automatizado en el procesador MR.SPOT[®].

5.4.1. Preparación de reactivos

Sacar los reactivos y los pocillos de ensayo HISTO SPOT[®] de la nevera y dejar que alcancen la temperatura ambiente.

En el tampón de hibridación y en la solución de lavado astringente se pueden observar cristales de sal. Si hay cristales, calentar los reactivos hasta 30°C para disolver las sales. Calentar todo el contenido de la botella, no una alícuota.

El conjugado ha de diluirse 1:1666 en tampón de bloqueo. El conjugado diluido se debe preparar fresco cada vez que se realice un ensayo.

El conjugado se tiene que agitarse en vortex y centrifugarse antes del paso de dilución!

El Volumen de reactivos necesarios variarán en función del número de tiras del ensayo. MR.SPOT[®] muestra los volúmenes requeridos para el número de tiras elegidas. Rellenar con los volúmenes necesarios de reactivos los pocillos correspondientes de la cubeta de reactivos

Coloque los pocillos de prueba y la placa de PCR en el bloque apropiado del procesador MR.SPOT[®]. Compruebe que quede bien colocada la placa de PCR.

Asegúrese que no hay suciedad o partículas de plástico en el soporte de la placa de reacción, porque podría interferir en la transmisión del calor durante la hibridación.

Las tiras de pruebas pueden separarse en pocillos individuales como se indica en la Figura 1, si se van a realizar menos de 8 pruebas. Si se usan pocillos separados prestar atención para colocarlas adecuadamente en el soporte de reacción y que no estén giradas unas contra otras.

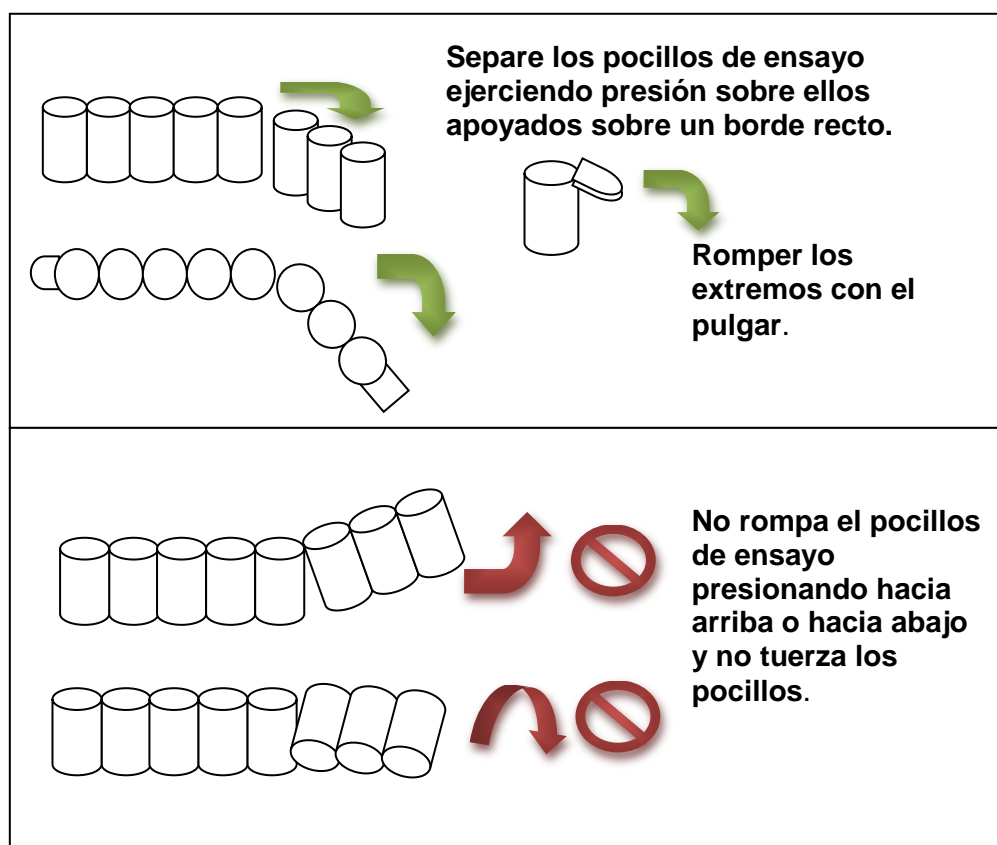


Figura 1: Separación de los pocillos de ensayo en pocillos individuales.

5.4.2. Configuración del procesador MR.SPOT®

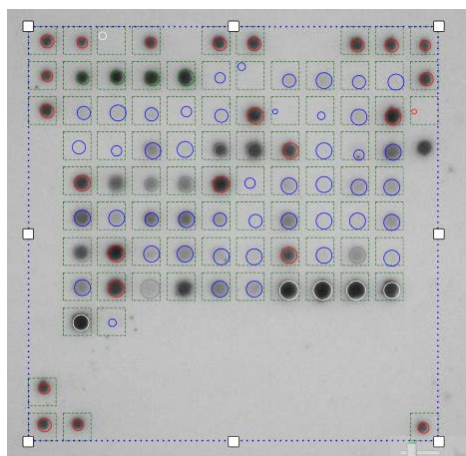
Encienda en procesador MR.SPOT®. Aparecerá la pantalla de inicio. Seguir el proceso como se indica en la pantalla. Los detalles se describen en el manual de usuario del procesador MR.SPOT®.

Nota: El Procesador MR.SPOT® y los reactivos no deben exponerse directamente a la luz solar.

5.4.3. Transferencia de resultados a un PC para la interpretación

La transferencia de datos al software HISTO MATCH a través de una red o utilizando una memoria USB viene descrita en el manual de HISTO MATCH.

5.4.4. Interpretación de los resultados



Abrir el software HISTO MATCH (si aun no esta instalado, se puede instalar desde el CD suministrado con el procesador MR.SPOT®) e interpretar los datos como se describe en el manual del software HISTO MATCH.

Las imágenes deben parecerse al ejemplo mostrado en la figura 2, y la figura 3 muestra una ilustración esquemática de los resultados y las funciones de las diferentes sondas.

El color de los círculos que rodean las sondas indica su función (ver manual del Software HISTO MATCH para más detalles).

Figura 2: Imagen de un resultado de HLA-A

●	●		●		●	●			●	●	●
●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	●
●	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	
	○	○	○	●	●	●	○	○	○	●	●
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	●	○	○	○	○	●	○	○	○	
	○	●	○	●	○	○	●	●	●	●	
	●	○									
●											
●	●										●

●: **Sondas de Posicionamiento:** Reaccionan con los primers de amplificación presentes en la mastermix e indican que la mastermix se ha añadido y que todos los reactivos durante el proceso de tipaje SSO se han añadido correctamente. Además, permiten al software localizar y orientar la imagen. El patrón es específico para cada sublote ("batch").

●+●: **Controles de amplificación** para el Exón 2 y el Exón 3 por duplicado. Estas sondas son universales para todos los alelos del locus respectivo y muestran que la PCR ha funcionado correctamente, También funcionan como referencia para las sondas específicas de alelo.

●: Sonda específica de alelo **Positiva**.

○: Sonda específica de alelo **Negativa**.

Figura 3: Ilustración esquemática del resultado y función de las sondas.

6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

HISTO SPOT® está diseñado para el diagnóstico "in vitro" y lo debe utilizar personal cualificado con la formación adecuada. Todo trabajo se debe realizar utilizando buenas prácticas de laboratorio.

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).

La solución de bloqueo, el tampón de hibridación, el tampón de lavado astringente y el tampón de lavado TBS contienen ProClin®150 y la solución de cloruro de magnesio contiene ProClin®300. Los reactivos sólo contienen 0.001% de conservante, no obstante se debe evitar el contacto con la piel y las membranas mucosas.

La Master mix y el conjugado contienen el conservante azida de sodio. Los reactivos contienen <0,1% azida de sódica que no se consideran concentraciones peligrosas. No obstante evitar el contacto con la piel y las membranas mucosas. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre formando azidas metálicas explosivas. Cuando se desecha soluciones que contienen azida sódica en el laboratorio, se debe enjuagar las cañerías con mucha agua para prevenir la acumulación de azida.

Todo el trabajo con los reactivos se deben realizar con las debidas precauciones. Cuando se manipulan reactivos se debe utilizar protección para los ojos, batas de laboratorio y guantes desechables. Evitar el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con abundante agua. Sin tratamiento se pueden producir quemaduras.

Si se producen derrames de reactivos, diluir con agua antes de secarle. No exponga el sustrato a los metales, contiene agentes oxidantes.

La eliminación de las muestras, los reactivos sin utilizar y los residuos debe estar en conformidad con las regulaciones locales, estatales y federales del país.

Evitar la contaminación microbiana de los reactivos al extraer alícuotas de las botellas. Se recomienda utilizar pipetas desechables estériles y puntas de pipeta. No utilizar reactivos con pruebas de turbidez o contaminación microbiana.

En la página www.bag-healthcare.com hay disponibles para descargar **Hojas de Datos de Seguridad de Materiales (MSDS)**.

7. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMIENTO

7.1. Evaluación

A todos los kits HISTO SPOT® SSO se le han realizado estudios de evaluación con muestras de ADN pre-tipificadas. Los resultados se compararon con otros métodos de tipificación (p. ej. SSP, Secuenciación). No se observaron diferencias entre los métodos de tipificación. Para cada lote se verificó la especificidad de cada sonda con ADN de muestras de referencia.

7.2. Reacción de amplificación PCR

En la información específica de cada lote se incluye los alelos amplificados con cada kit HISTO SPOT[®] SSO, la nomenclatura HLA liberada a que se refiere y los exones que se amplifican. Esta se encuentra en un CD en cada kit.

7.3. Resolución del ensayo

La sistema de tipificación HISTO SPOT[®] SSO está diseñado para proporcionar resultados no ambiguos al menos a nivel de grupo de alelos, es decir de dos dígitos. Diferentes combinaciones de alelos que cruzan grupos de alelos pero tienen el mismo patrón de sonda positiva son consideradas como ambigua.

Los kits de tipificación **HISTO SPOT[®] 4D** normalmente dan resultados a nivel de alelos (4 dígitos) si se utilizan filtros de alelos comunes. Los criterios para ese filtro de alelo común son los siguientes: frecuencia del alelo $\geq 0,5\%$ por lo menos en una población con un tamaño de muestra de al menos 1000 muestras en el sitio web www.allelefrequencias.net.

8. LIMITACIONES DEL MÉTODO

Debido a la alta susceptibilidad del método de PCR a las variaciones de concentración y calidad del ADN, sólo se debe utilizar muestras de ADN que tengan una concentración entre 15 y 30 ng/ μ l y una índice de pureza (coeficiente de extinción DO_{260}/DO_{280} : entre 1,5 y 2,0 / coeficiente de extinción DO_{260}/DO_{230} : $>1,8$).

Debe tener sumo cuidado para evitar la contaminación de los reactivos del kit y otros materiales de laboratorio y equipos con amplicones o ADN. Se recomiendan encarecidamente pruebas de limpieza regulares (p. ej. BAG Wipetest, [REF] 7091) y controles negativos con cada ensayo.

El ensayo de hibridación es un muy sensible a la temperatura de proceso. Por eso, los kits HISTO SPOT[®] SSO sólo se debe utilizar en combinación con el procesador MR.SPOT[®] para asegurar la correcta temperatura y tiempo de incubación.

Todos los instrumentos (p. ej. pipetas, termocicladores, bloques de calor; el procesador MR.SPOT[®]) se deben calibrar de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La precisión y uniformidad de temperatura del termociclador se puede comprobar con el BAG CyclerCheck ([REF] 7104).

9. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

El control de la calidad interno de nuevos lotes de kits HISTO SPOT[®] SSO se puede realizar utilizando una combinación de muestras de ADN con tipo HLA conocido.

En cada pocillo de ensayo hay controles positivos internos para garantizar el éxito de la amplificación y la hibridación.

Se recomiendan controles negativos para detectar posibles contaminaciones. Utilizar una reacción de PCR sin ADN en el posterior ensayo de hibridación como un control negativo.

10. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Síntoma	Posible problema(s)	Posible solución(es)
Mal funcionamiento del Instrumento	Numerosos	Consulte el manual de MR.SPOT®
Mensaje de Error durante la transferencia de datos	Fallo en la transferencia de datos	Transferir manualmente los datos utilizando unidad USB
Sin resultado	Fallo al cuadrricular la imagen	Realizar un cuadrulado manual
No hay spots en el pocillo	Fallo al añadir la Master Mix a la PCR.	Repetir todo el ensayo y verificar el producto del PCR en gel
Sólo spots control positivo	Fallo al añadir el ADN a la PCR o fallo de amplificación	Repetir todo el ensayo y verificar el producto del PCR en gel
Sondas falso positivo	Se ha utilizado demasiado ADN o una concentración excesiva del conjugado (no centrifugado).	Compruebe la concentración de ADN Centrifugue el conjugado antes de utilizar.
Pérdida de exones	Concentración del ADN demasiado alta o ADN degradado	Comprobar la concentración del ADN, correr un gel con el ADN
Ningún resultado / resultado no concluyente debido a las señales débiles	Error de dilución del conjugado o mala amplificación. Mal funcionamiento del Instrumento	Repita el ensayo. Comprobar la temperatura de hibridación en el instrumento




11. MARCAS COMERCIALES UTILIZADAS EN ESTE DOCUMENTO/PRODUCTO

Proclin® es una marca registrada de la compañía Rohm and Haas.

BCIP® es una marca registrada de Sigma Aldrich Co.

Veriti™ es una marca registrada de Applied Biosystems.

12. EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL ETIQUETADO

IVD	Para diagnóstico in vitro
	Temperatura de almacenamiento
LOT	Código de Sublotes
	Usar antes de
REF	Referencia
	Consulte las Instrucciones de uso
TIPAJE HLA	Finalidad: Tipaje HLA
Mastermix A	Master mix para la amplificación del locus HLA-A
Mastermix B	Master mix para la amplificación del locus HLA-B
Mastermix C	Master mix para la amplificación del locus HLA-C
Mastermix DRB1	Master mix para la amplificación del locus HLA-DRB1
Mastermix DQB1	Master mix para la amplificación del locus HLA-DQB1
Mastermix DQ	Master mix para la amplificación del locus HLA-DQB1 y DQA1
Mastermix DPB1	Master mix para la amplificación del locus HLA-DPB1
Mastermix DRB3/4/5	Master mix para amplificación del loci HLA-DRB3/4/5
Testwells A	Pocillos de ensayo con sondas para el tipaje del locus HLA-A
Testwells B	Pocillos de ensayo con sondas para el tipaje del locus HLA-B
Testwells C	Pocillos de ensayo con sondas para el tipaje del locus HLA-C
Testwells DRB1	Pocillos de ensayo con sondas para el tipaje del locus HLA-DRB1
Testwells DQB1	Pocillos de ensayo con sondas para el tipaje del locus HLA-DQB1
Testwells DQ	Pocillos de ensayo con sondas para el tipaje del locus HLA-DQB1 y DQA1
Testwells DPB1	Pocillos de ensayo con sondas para el tipaje del locus HLA-DPB1
Testwells DRB3/4/5	Pocillos de ensayo con sondas para el tipaje del loci HLA-DRB3/4/5
MgCl₂	Cloruro de magnesio
BLOCKBUF	Tampón de bloqueo
HYBBUF	Tampón de hibridación
STRGWASH	Solución de lavado astringente
TBS	Solución salina tamponada con TRIS
SUBS	Sustrato
CONJ	Conjugado con Fosfatasa alcalina con estreptavidina

Instrucciones de uso en otros idiomas, consultar:

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

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

Teléfono +49 (0)6404-925-125