

ES

Instrucciones de uso

# KIR-TYPE Epitop-TYPE

## Low resolution

“Kit” de Pruebas para el tipado de los Genotipos-KIR y sus ligandos HLA basado en genética molecular



IVD

**10 Tipificaciones  
listo para usar, prealicutado**

<b>REF</b>	<b>7105</b>	<b>KIR-TYPE</b>
<b>REF</b>	<b>7106</b>	<b>Epitop-TYPE</b>

### Contenidos

1. Descripción del Producto .....	2
2. Material.....	3
2.1.1 Contenidos del “kit” KIR-TYPE.....	3
2.1.2 Contenidos del “kit” Epitop-TYPE .....	3
2.2 Requerimientos y material suplementario .....	3
2.3 Almacenamiento y estabilidad .....	3
3. Datos de funcionamiento .....	3
4. Procedimiento de la Prueba.....	4
4.1 Condiciones de Seguridad y Observaciones especiales.....	4
4.2 Extracción de ADN.....	4
4.3 Amplificación.....	4
4.4 Electroforesis en Gel .....	6
4.5 Fotodocumentation e Interpretación .....	6
5. Avisos y Precauciones.....	6
6. Solución de Problemas .....	7
7. Bibliografía.....	7
8. Explicación de los símbolos usados en el Etiquetado .....	8

**Versión: 8/2014 / Distribución: 2014-07**

## 1. Descripción del Producto

Las células “Natural killer” (NK) y las subpoblaciones de linfocitos T con un fenotipo de memoria CD8<sup>+</sup> (1) o receptores de célula T  $\gamma\delta$  expresan *Receptores* inhibidores y activadores de célula “Killer” tipo-*Inmunoglobulina* (KIRs). Debido a las diferencias en la cantidad de genes y al diferente polimorfismo de genes concretos, la región génica de los receptores KIR muestra una alta variabilidad dentro de un mismo individuo (3, 4). Mientras se han identificado moléculas HLA clase I definidas como ligandos para receptores KIR concretos (5, 6). El receptor inhibidor KIR2DL1 se une a alelos del grupo 2 de moléculas de HLA-C, que tienen los aminoácidos Asn<sup>77</sup> y Lys<sup>80</sup>, los receptores KIR2DL2 / KIR2DL3 a alelos del grupo 1 de moléculas de HLA-C, con los aminoácidos Ser<sup>77</sup> y Asn<sup>80</sup>, y KIR3DL1 tiene una afinidad por los alelos de HLA-B con un epítipo Bw4 en la posición aminoacídica 77-83 de la  $\alpha$ 1-hélice. El receptor inhibidor KIR3DL2 se une a alelos de los grupos HLA-A\*03 y \*11 (7). Los ligandos de los receptores activadores KIR no están suficientemente documentados – aunque se postula, que tienen una afinidad con las mismas moléculas HLA-B y HLA-C que sus receptores inhibidores relativos.

El modelo más aceptado ahora para la activación de células NK, es la presunción, que la reactividad de las células NK está controlada por un equilibrio entre señales inhibitoras y activadoras. Por tanto una activación de células NK puede suceder debido a la reducción de señales inhibitoras o al aumento de ligandos uniéndose a receptores activadores. En el caso de procesos de transformación (p.ej.: tumores o infecciones víricas) con una pérdida acompañada de la expresión de HLA como ligando, la pérdida de señales inhibitoras resulta en la activación de las células NK y la lisis de la célula “diana”. Esta observación forma la base de la hipótesis del “missing self”, en la que un tejido sano con una expresión estable de HLA está a salvo de una activación de células NK (8).

En particular un gran número de estudios ha demostrado que la disparidad HLA/KIR conduce a una reactividad de células NK donante contra receptor en trasplantes de médula ósea que resultan en la reducción de la Enfermedad “Graft vs. Host” (GvHD) y recaídas (9). Además unos genotipos KIR concretos podrían estar asociados con enfermedades autoinmunes (p.ej.: Psoriasis), progresión reducida a pleno SIDA en pacientes VIH, riesgo de preeclampsia y rechazo agudo tras un trasplante alogénico de riñón (10-14).

El “kit” **KIR-TYPE** permite el genotipado de 14 genes KIR y 2 pseudogenes. Por otra parte el “kit” **Epitop-TYPE** detecta los alelos de las especificidades HLA-Cw Asn<sup>80</sup>, HLA-Cw Lys<sup>80</sup>, HLA-B Bw4<sup>Threo</sup>, HLA-B Bw4<sup>Iso</sup> y HLA-A Bw4.

La detección de los Receptores KIR / HLA ligandos KIR individuales se realiza aplicando la metodología PCR-SSP, con “primers” específicos de secuencia (ver Figura. 1) (13, 15).

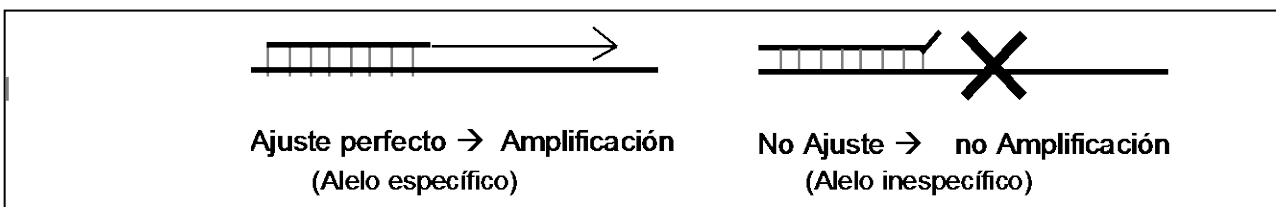


Figura 1: Principio de una PCR-SSP

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.

La selección de los “primers” específicos de secuencia permite la detección de los genes KIR / HLA individuales basado en ADN genómico.

La composición de las mezclas de “primers” individuales permiten la identificación clara de los genotipos KIR / especificidades HLA posibles indicados en el diagrama de evaluación respectivo. Para cada tipaje se usan cierto número de mezclas de reacción **prealicuotadas** y **secas** que incluyen un control interno de amplificación con un volumen final de 10 $\mu$ l.

## 2. Material

### 2.1.1 Contenidos del “kit” KIR-TYPE

- ◆ Placas KIR-TYPE para tipado de KIR. Las mezclas prealiquotadas y secas están formadas por “primers” específicos de alelo, “primers” para el control interno (secuencia específica del cromosoma 1) y nucleótidos. La primera mezcla de reacción está marcada y contiene el control de contaminación / control negativo con los “primers” del control interno y los específicos del amplificado. La última mezcla incluye el control positivo (sólo los “primers” del control interno). El número de lote está impreso en cada placa.
- ◆ Tampón de PCR 10x
- ◆ Tiras de tapones de PCR (de 8).
- ◆ Instrucciones de uso, hoja de trabajo, tabla de especificidades

### 2.1.2 Contenidos del “kit” Epitop-TYPE

- ◆ Tiras Epitop-TYPE para el tipado “Epitop”. Las mezclas prealiquotadas y secas están formadas por “primers” específicos de alelo, “primers” para el control interno (secuencia específica del cromosoma 1) y nucleótidos. La primera mezcla de reacción está marcada (impresión del número de lote). La última mezcla contiene el control de contaminación / control negativo.
- ◆ Tampón de PCR 10x
- ◆ Tiras de tapones de PCR (de 8).
- ◆ Instrucciones de uso, hoja de trabajo

## 2.2 Requerimientos y material suplementario

- ◆ Taq Polimerasa (5 U/μl), (p.ej.: HISTO TAQ, [REF](#) 70975)  
**!!! No usar una Taq Polimerasa “Hot-start” !!!**
- ◆ “Kit” **BAG EXTRA-GENE I** ([REF](#) 7059), opcional, 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 5)
- ◆ 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)
- ◆ Fuente UV (220 - 310 nm)
- ◆ Sistema de Fotodocumentación de Geles

## 2.3. Almacenamiento y estabilidad

Los “kits” se entregan a temperatura ambiente. 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!**). 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 genotipos KIR / especificidades HLA (basados en los últimos datos de secuencia) indicados en la hoja de trabajo. Se realizarán actualizaciones con regularidad.

La precisión y reproducibilidad de la especificidad de cada mezcla de “primers” fue verificada con ADN de muestras control, con especificidades conocidas de “KIR” y “Epitop”. Los alelos, que no están incluidos y debido a su rareza no se han probado respectivamente, están indicados en las hoja de trabajo / tabla de especificidades.

Se realizó un estudio de funcionamiento de los “kits” KIR-TYPE y Epitop-TYPE con al menos 50 muestras de ADN. No se encontraron discrepancias entre los resultados obtenidos con los otros tipajes realizados con “kits” SSP de otros fabricantes.

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” KIR-TYPE y Epitop-TYPE están validados con HISTO TAQ (REF 70975) y Taq Polimerasa de Qiagen, respectivamente. Usando otra Taq Polimerasa, la enzima debe ser validada para los “kits” KIR-TYPE / Epitop-TYPE por el usuario.

Se puede garantizar un tipado fiable si se usan de 50-80ng 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/DGI 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 DNA

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 [5]. 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)
- $DO_{260}/DO_{230} = >1.8$  (indicador 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 de los “kits” el número de placas KIR-TYPE / tiras Epitop-TYPE y el tampón de PCR 10x.
2. Pipetear la Master-Mix formada por tampón de PCR 10x, solución de ADN, Taq-Polimerasa y H<sub>2</sub>O destilada y mezclar bien. Los “kits” KIR-TYPE / Epitop-TYPE funcionan con la misma Master-Mix que los otros “kits” HISTO TYPE SSP y por lo tanto se pueden combinar. La composición de la Master-Mix se muestra en la Tabla 1.

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. Después añadir el ADN y distribuir la Master-Mix en las mezclas de reacción precargadas.

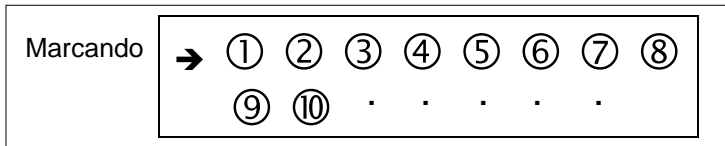
**Tabla 1: Composición de la Master-Mix dependiendo del N° de mezclas de reacción:**

N° de mezclas	Agua dest.	Tampón de PCR 10x	Solución-ADN (25 - 40 ng/µl)	Taq-Polimerasa (5 U/µl)	Volumen total	
1	7	1	2	0,08	10	µl
<b>6</b>	<b>55</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>0,64</b>	<b>80</b>	<b>µl</b>
<b>22</b>	<b>180</b>	<b>26</b>	<b>52</b>	<b>2,1</b>	<b>260</b>	<b>µl</b>
28	221	32	64	2,6	320	µl

⇒ La cantidad de ADN por mezcla debería ser 50 – 80ng. Según la concentración de ADN, la cantidad de ADN y agua se tiene que ajustar (p.ej.: para 22 mezclas: 26µl ADN (50 ng/µl) y 206µl de Agua destilada).

⇒ Si se usase otra Taq Polimerasa, la enzima debe ser validada para los “kits” KIR-TYPE / Epitop-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	N° de Ciclos
Desnat. Inicial	94°C	<b>2 Min</b>	1 Ciclo
Desnaturalización	94°C	15 Seg	10 Ciclos
Anillamiento	65°C	50 Seg	
Extensión	72°C	45 Seg	
Desnaturalización	94°C	15 Seg	20 Ciclos
Anillamiento	61°C	50 Seg	
Extensión	72°C	30 Seg	

**Termocicladores Validados:**  
 PTC 200 / C1000 (MJ Research/ BioRad),  
 GeneAmp PCR-System 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.**

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” 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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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 un sistema adecuado de fotodocumentación de geles. 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).

Sólo se deben considerar positivas las bandas que tengan el tamaño correcto en comparación con el estándar de longitud de ADN. Los tamaños correctos vienen en las hojas de trabajo. En todas las calles sin amplificación específica de alelo, se debe ver claramente una banda de **659bp** del control interno. ¡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.

### **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).

El desecho de reactivos se debe realizar siguiendo las normas estatales y locales.

**Las Hojas de Datos de Seguridad de los Materiales (MSDS)** se pueden descargar en [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com).

## 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, 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
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 demasiado, concentración de EtBr demasiado alta	sumergir el gel en H <sub>2</sub> 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

- Moretta A, Bottino C, Pende D, Tripodi G, Tambussi G, Viale O, et al. Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 1990; 172(6):1589-98.
- Phillips JH, Gumperz JE, Parham P, Lanier LL. Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science* 1995;268(5209):403-5.
- Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002;190:40-52.
- Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002;169:5118-5129.
- Carrington M, Norman P. The KIR gene cluster. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2003. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono\\_003/ch1d1.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf).

6. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in the balance: KIR and their role in disease. Mol Interv 2005; 5: 226-40.
7. Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. J Immunol 1996; 156: 3098-101.
8. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. Immunol Today 1990; 11:237-44.
9. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. Science 2002; 295:2097–2100.
10. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. J Immunol. 2004 Oct 1;173(7):4273-6
11. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. Nat Genet. 2002 Aug;31(4):429-34.
12. Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. J Exp Med. 2004 Oct 18;200(8):957-65.
13. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens 39:225-235
14. Kunert K, Seiler M, Mashreghi MF, Klippert K, Schönemann C, Neumann K, Pratschke J, Reinke P, Volk HD, Kotsch K. KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation.
15. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens 41:55-56
16. Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
17. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166

## 8. Explicación de los símbolos usados en el Etiquetado

	Temperatura de almacenamiento
	Usar antes de
	Consultar instrucciones de uso
	Suficiente para "n" pruebas
<b>CONT</b>	Contenido, contiene
<b>CONTROL CC</b>	Control de Contaminación
<b>KIR TYPING</b>	Propósito de uso: Determinación de Genotipos de KIR (Receptores de células "Killer" tipo Inmunoglobulina)
<b>KIR HLA-LIGAND TYPING</b>	Propósito de uso: Determinación de Ligandos HLA de KIR (Receptores de células "Killer" tipo Inmunoglobulina)
<b>IFU</b>	Instrucciones de uso
<b>IVD</b>	Para uso en Diagnóstico in Vitro
<b>LOT</b>	Código de Sublote
<b>OR</b>	ó
<b>PCRBUF 10x</b>	Tampón de PCR, concentrado 10x
<b>PCRCAP</b>	Tapones de PCR
<b>PCRPLATE</b>	Placas de PCR
<b>PCRSTRIP</b>	Tiras de PCR
<b>REACTIONMIX</b>	Mezclas de Reacción
<b>REF</b>	Referencia
<b>RTU</b>	Listo para usar
<b>WORKSHEET</b>	Hoja de Trabajo

**Instrucciones de uso en otros idiomas, consultar:**

**<http://www.bag-healthcare.com> <http://service.bag-healthcare.com> o marcar: +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](http://www.bag-healthcare.com)  
[info@bag-healthcare.com](mailto:info@bag-healthcare.com)

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

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