

HLA SSP Kits

SSP-Reagenzienkit für die HLA-Typisierung auf DNA-Basis
Ready to use SSP reagent kit for DNA based HLA typing
Trousse de réactifs SSP pour le typage HLA, basé sur l'ADN
Kit di reagenti SSP per tipizzazione HLA basata sul DNA
Juego de reactivos SSP para la tipificación del antígeno

IVD

For In Vitro Diagnostic Use

HLA-A SSP	REF	826 201	CE 0197
HLA-B SSP	REF	826 206	CE 0197
HLA-C SSP	REF	826 212	CE
DRB SSP	REF	826 215	CE 0197
DQB SSP	REF	826 220	CE
ABDR SSPtray	REF	826 230	CE 0197
ABC SSPtray	REF	826 240	CE 0197

**Besondere Hinweise für den Anwender / Special remarks for the user /
Remarques importantes pour l'utilisateur / Avvertenze per l'utilizzatore /
Indicaciones importantes para el usuario:**

SSP TYPING KITS WITH TAQ-POLYMERASE - LIMITED LICENSE:

The purchase price of this product includes limited, non-transferable rights under U.S. Patents 4,683,202, 4,683,195 and 4,965,188 and their foreign counterparts, owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"), to use only this amount of the product to practice the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process described in said patents solely for the HLA Typing applications of the purchaser solely for organ or tissue or bone marrow transplantation, and explicitly excludes analysis of forensic evidence or parentage determination. The right to use this product to perform and to offer commercial services for HLA Typing for organ or tissue transplantation using PCR, including reporting the results of the purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is also hereby granted. Further information on purchasing licenses to practise PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

SSP TYPING KITS WITHOUT TAQ-POLYMERASE - DISCLAIMER OF LICENSE:

This product is optimized for use in the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process which is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"). No license under these patents to use the PCR Process is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product. Further information on purchasing licenses to practise PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

REF	GB DE ES IT FR NL DK CZ	Article number Artikelnummer Artikulo numero Codice prodotto Référence du produit Artikelnummer Artikelnummer Katalogové číslo	IVD	GB DE ES IT FR NL DK CZ	For in vitro diagnostic use Nur zur in-vitro Diagnostik Sólo para el diagnóstico in vitro Solo per la diagnostica in vitro Pour le diagnostic in vitro Voor in vitro gebruik Til diagnostik brug i glas Použití pro in vitro diagnostiku			
BLOCK	GB DE ES IT FR NL DK CZ	PCR block PCR-Block PCR bloque PCR blocco PCR bloc PCR blok PCR blok PCR blok	NC	GB DE ES IT FR NL DK CZ	negative control Negativkontrolle control negativo controllo negativo contrôle négatif negatieve controle negativ kontrol negativní kontrola	CK	GB DE ES IT FR NL DK CZ	PCR cocktail PCR-Cocktail PCR coctel PCR cocktail PCR cocktail PCR cocktail PCR blandings PCR koktejl

ÍNDICE

1. Introducción	4
1.1 Indicación de uso	4
1.2 Base teórica	4
1.3 Principio del ensayo	4
2. Material	4
2.1 Contenido del equipo HLA SSP	4
2.2 Indicaciones generales de seguridad	5
2.3 Almacenamiento y Conservación	5
3. Aparatos requeridos	5
3.1 Programación del termostato	5
3.2 Electroforesis de gel	6
4. Material de ensayos	6
4.1 Aislamiento de ADN	6
4.2 Preparación de los ensayos	6
5. Realización del ensayo	7
5.1 Material necesario	7
5.2 Material adicional imprescindible	7
5.3 PCR	7
5.4 Electroforesis de gel	8
6. Resultados	9
6.1 Valoración	9
6.2 Límites del procedimiento	9
6.3 Control de calidad	10
6.4 Caracterización específica	10
7. Búsqueda de errores	11
8. Bibliografía	12

1. Introducción

1.1 Ámbito de aplicación

Los equipos HLA SSP (SSP, Sequenz Specific Primer) se aplican para determinar las características de los antígenos HLA Clase I y Clase II a nivel del ADN.

1.2 Base teórica

El sistema HLA es un sistema de antígeno complejo codominante que juega un papel fundamental en la distinción entre „lo propio“ y „lo no-propio“. En un trasplante de órganos, la compatibilidad de los antígenos HLA entre el donante y el receptor constituye uno de los criterios principales para la supervivencia del órgano ajeno. La determinación de los antígenos HLA es básica en la selección del donante y del receptor.

Gracias a la introducción de métodos de análisis basados en el ADN se han abierto nuevos caminos en el diagnóstico moderno. Los antígenos HLA se pueden diferenciar con tan sólo modificar un aminoácido en la cadena polipeptídica. Por lo general, estas estructuras, en gran parte idénticas, no se pueden diferenciar con ayuda de la serología. La capacidad de resolución de los métodos serológicos resulta, por lo tanto, limitada. Puesto que entretanto ya se conocen las secuencias de ADN de la mayoría de los alelos HLA, se pueden identificar las variaciones de estas secuencias mediante oligonucleótidos sintéticos. La amplificación genómica de ADN (PCR, Polymerase Chain Reaction) con pares de cebadores específicos (SSP, Sequence Specific Primers) hace posible la identificación de un gran número de los alelos HLA que se conocen hasta ahora.

1.3 Principio del ensayo

Los equipos HLA SSP son sistemas de ensayo destinados a la tipificación de las características del antígeno HLA mediante la técnica PCR. El método SSP se sirve del cebador de secuencia específica en la reacción de amplificación para realizar la tipificación. El método se basa en el principio que consiste en que sólo los cebadores con secuencias totalmente complementarias a la secuencia meta de un ensayo existente de ADN se ligan a este ADN y generan un amplificado en una reacción de PCR. Los cebadores que no son complementarios no se combinan con el ADN y no se produce ninguna amplificación.

El análisis del ADN amplificado se realiza con ayuda de la electroforesis de gel de agarosa. Una amplificación llevada a cabo con éxito genera un fragmento de ADN de longitud definida que se puede reconocer en el gel como una banda. Si no se produce la amplificación, falta esta banda.

La composición de las mezclas de cebadores permite la asignación clara de las características del antígeno HLA. El ámbito de aplicación del sistema de comprobación es la determinación de los alelos HLA individuales en los donantes y receptores de órganos así como en los pacientes con sustitución de sangre o de los componentes sanguíneos.

2. Material

2.1 Contenido del equipo HLA SSP

El contenido del juego HLA SSP es el suficiente para realizar de 24 ensayos.

- 24 Bloques de PCR respectivamente **BLOCK**, que se componen de vasos de PCR que contienen los cebadores / mezclas de nucleótidos secos. Como orientación se incluye una marca negra en la posición 1 (=H1).
- El cocktail de PCR **CK** (listo para su uso)
El cocktail de PCR contiene buffer de PCR (concentración final: 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, al 0,001% Gelatina), rojo de cresol y glicerina.
- Tiras de capuchones PCR o láminas de cubierta de PCR
- Esquemas de valoración, reacción, posición de cebadores

Se adjunta un control negativo **NC** como tubo adicional de PCR (incolore) en caso de que no esté incluido ya en el bloque de PCR **BLOCK**.

2.2 Indicaciones generales de seguridad

Reactivos para su uso exclusivo para el diagnóstico in vitro **IVD**

- Cuidado:** El ensayo se debe llevar a cabo exclusivamente por personal especializado instruido y autorizado.
- Cuidado:** Emplee todos los reactivos respetando siempre las normas de seguridad y medidas de precaución habituales en laboratorios. No pipetee con la boca.
- Cuidado:** Todos los reactivos de ensayo se deben manejar como sustancias potencialmente infecciosas y, por lo tanto, se deben adoptar las medidas de precaución pertinentes.
- Cuidado:** Los bloques de PCR utilizados se deben manejar como elementos potencialmente infecciosos y, por lo tanto, se tienen que eliminar siguiendo las correspondientes normas nacionales vigentes.
- Cuidado:** No emplee ningún reactivo una vez pasada la fecha de caducidad señalada en la etiqueta.
- Cuidado:** No emplee ningún reactivo que sospeche que pueda estar contaminado con microbios.
- Cuidado:** Emplee pipetas separadas en la zona Post-PCR y en la zona Pre-PCR.
- Cuidado:** **El bromuro de etidio** que se emplea para colorear el ADN en la electroforesis de gel **es potencialmente cancerígeno**. Utilice siempre guantes de protección cuando trabaje con geles coloreados. Elimine los residuos quemándolos.
- Cuidado:** Emplee una protección ocular que bloquee los rayos UV cuando trabaje con luz ultravioleta.

Para más información puede solicitar a Biotest los pliegos de datos de seguridad de todos los reactivos.

2.3 Almacenamiento y Conservación

Los reactivos SSP (**BLOCK**, **CK**, **NC**) se tienen que almacenar a una temperatura comprendida entre los 2°C y los 8°C. La fecha de caducidad aparece en los envases de los componentes del juego.

Los bloques de PCR **BLOCK** están soldados a la bolsa. Los bloques restantes en una bolsa abierta se deben mantener en su envase original y cerrarlos con cinta aislante para evitar que entre humedad. Los envases abiertos se deben usar en un plazo de 4 semanas.

3. Aparatos necesarios

3.1 Programación del termostato

Programa HLA SSP:

Desnaturalización inicial:	94°C	2 minutos		
Desnaturalización:	94°C	10 segundos	}	10 ciclos
Annealing y Extensión:	65°C	60 segundos		
Desnaturalización:	94°C	10 segundos	}	20 ciclos
Annealing:	61°C	50 segundos		
Extensión:	72°C	30 segundos		

El programa de PCR que figura a continuación se ha adaptado al termostato de la empresa Perkin Elmer. El porcentaje de calentamiento/enfriamiento alcanza en los ensayos una media de 1°C/segundo en el termostato PE 9700 y la precisión de temperatura es de ± 0,25°C por término medio en el margen comprendido entre los 35°C y los 100°C. Otros termostatos distintos a los aconsejados los tiene que validar el usuario. Los termostatos que no cuentan con una placa de presión ajustable necesitan una esterilla de adaptador para garantizar una transmisión térmica óptima desde la tapa de la calefacción hasta los tubitos de PCR.

3.2 Electroforesis de gel

Con respecto a la realización de la electroforesis de gel, véase el apartado 5.

4. Material de ensayos

4.1 Aislamiento de ADN

El ADN genómico se puede extraer a partir de todas las células con núcleo. El método más sencillo consiste en aislar el ADN a partir de suspensiones de células (sangre, Buffy Coat o células mononucleares de cultivo, células de cultivo). Existe una gran serie de protocolos para el aislamiento del ADN a partir de células. En el ensayo de PCR-SSP sólo se realiza este procedimiento si se pretende obtener un ADN de calidad y cantidad suficientes para efectuar el PCR, como, por ejemplo, el método de precipitación por sal (2).

Entre los proveedores de juegos comerciales de extracción de ADN recomendamos por su idoneidad por ejemplo, „Puregene“ de la empresa Genra Systems o „Super Quick Gene“ de la empresa Analytical Genetic Testing Center.

4.2. Preparación de los ensayos

4.2.1 Ensayos

Para realizar la tipificación se necesita sangre periférica anticoagulada (como, por ejemplo, citrato de sodio, EDTA). Para más información sobre el almacenamiento y la estabilidad de los análisis de sangre consulte con el proveedor del juego de extracción de ADN. Esta información la tiene que validar el usuario.

4.2.2 Contaminación

La contaminación del ADN por inhibidores de PCR, como la hemoglobina, la heparina y el etanol entre otras sustancias puede acarrear alteraciones sensibles del PCR. Por esta razón, **no** se debe emplear sangre con heparina, sino más bien sangre citrada o sangre EDTA como material de partida para el aislamiento de ADN. En caso de que el paciente esté heparinizado, hay que aplicar eventualmente otro método de aislamiento de ADN o utilizar otro material de partida para el aislamiento de ADN.

4.2.3 Material de ensayos hemolizado

Se debe evitar la aplicación de ensayos lipémicos o hemolizados. Las pruebas sin agente anticoagulante o el material que se ha congelado varias veces y vuelto a congelar también se deben evitar dado que estas condiciones no garantizan la calidad y cantidad suficientes del ADN que se aisle a partir de estas pruebas.

4.2.4 Cantidad del ADN

Vuelva a suspender el ADN aislado en agua destilada estéril y regule la concentración a 100 ± 50 ng/ μ l. El ADN **no se debe resuspender** en reactivos que contengan quelantes, como por ejemplo, **EDTA**, en una concentración $> 0,5$ mM.

4.2.5 Calidad del ADN

La determinación de la concentración del ADN se efectúa por medición de la densidad óptica (DO) en 260 nm (A_{260}). Un valor A_{260} de 1 (= 1 DO) corresponde aproximadamente a 50 μ g/ml de ADN de doble cadena.

Para determinar la contaminación del ADN con proteína se mide además la absorción en 280 nm y se calcula el cociente A_{260}/A_{280} . Un ADN puro presenta una relación A_{260}/A_{280} de 1,8 o superior. Los valores A_{260}/A_{280} inferiores a 1,8 indican la presencia de impurezas por proteína.

En un valor $A_{260}/A_{280} = 1,5$ la proporción de proteína asciende aprox. al 50% en la preparación de ADN.

Para obtener unos resultados de ensayo óptimos de PCR-SSP se precisa un ADN con un cociente A_{260}/A_{280} de $\geq 1,6$.

- ➡ La pureza y concentración del ADN son fundamentales para la obtención de resultados óptimos en el ensayo.

El ADN aislado se puede almacenar a una temperatura de -20°C durante largos periodos de tiempo (más de 1 año). Los detalles relativos al almacenamiento y a la estabilidad del ADN aislado los puede consultar en la información técnica del fabricante del juego de extracción de ADN utilizado.

5. Realización

5.1 Material necesario

Véase el apartado 2.1 Contenido del juego HLA SSP.

5.2 Material adicional imprescindible

5.2.1 Material de pruebas (ADN)

- Espectrofotómetro UV

5.2.2 PCR

- Taq ADN polimerasa (5 U/μl, por ejemplo, PE Applied Biosystems)
- Termorregulador con tapa térmica (por ejemplo, PE 9600, PE 9700 PE Applied Biosystems)
- Pipetas regulables
- Multipipeta Eppendorf con combitips (10 μl)
- Puntas de pipeta con filtro
- Agua destilada (dH₂O)

5.2.3 Electroforesis de gel

- Agarosa (de uso en biología molecular)
- Cámara de gel (adecuada para gel con un mínimo de 25 bolsas)
- Buffer 5 x TBE
 - Tris(hidroximetil)-aminometano (base)
 - Ácido bórico (H₃BO₃)
 - Na₂EDTA
- Solución de bromuro de etidio (10 mg/ml)
- ADN de longitud estándar (marcadores de 50 a 1000 bp) (no es imprescindible)
- Agitador magnético con placa térmica o un microondas
- Pipetas regulables
- Cámara Polaroid con filtro de rayos ultravioleta, película Polaroid tipo 667
- Transiluminador de UV (~ 200 - 300 nm)
- Aparato de alimentación
- Agua destilada (dH₂O)

5.3 PCR (Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa)

5.3.1 Medidas de precaución

El procedimiento de PCR es un método extremadamente sensible que permite reproducir incluso las cantidades más reducidas de ADN de manera efectiva. Por esta razón, incluso las huellas de ADN contaminado en una prueba se pueden amplificar en una reacción de PCR y falsificar, por lo tanto, el resultado del ensayo. Una fuente de contaminación especial constituye el ADN amplificado que entra en contacto con los ensayos que quedan a amplificar. Para evitar las contaminaciones con material amplificado recomendamos una separación estricta entre los espacios de trabajo tal y como se explica a continuación:

1. **Ámbito Pre-PCR:**
Todos los trabajos que se realicen con anterioridad al proceso de PCR (aislamiento y almacenamiento de ADN, elaboración y almacenamiento de reactivos y soluciones para la extracción del ADN y el proceso de PCR).
2. **Ámbito Post-PCR:**
Termorregulador, electroforesis de gel, valoración, almacenamiento de ADN amplificado. Aparatos y materiales usados procedentes del ámbito Post-PCR no deben llegar a la zona de Pre-PCR.
3. Para los trabajos en el ámbito Pre-PCR se deben emplear pipetas anti-aerosol (puntas de pipetas con filtro). En este caso recomendamos efectuar un control negativo en cada amplificación para detectar cualquier contaminación con ADN extraño.

5.3.2 Realización de una tipificación HLA-SSP

- (1) En una tipificación del antígeno HLA de un ensayo de ADN se efectúan reacciones PCR con un volumen de reacción de 10 µl por tubito de PCR. La marca negra en el bloque de PCR **BLOCK** sirve de orientación (posición H1).
- (2) Por **cada tipificación** en un vaso Eppendorf aplique una **mezcla maestra (mastermix)** con los siguientes componentes:
- Cocktail PCR **CK**
 - Taq ADN polimerasa (5U/µl)
 - dH₂O

Mezcle bien y añada 10 µl de esta mezcla a **NC**. Sólo después añada ADN (aprox. 100 ± 50 ng/µl) y mézclelo todo bien.

En la tabla siguiente figuran los volúmenes que se deben pipetear por ensayo:

Número de las reacciones de PCR	Composición de la mezcla maestra a:				
	8	18	24	48	96
Cocktail PCR CK	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq ADN polimerasa	0,7 µl	1,5 µl	1,8 µl	3,5 µl	7 µl
dH ₂ O	55 µl	125 µl	150 µl	288 µl	550 µl
ADN (aprox. 100 ± 50 ng/µl)	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

- (3) De esta mezcla maestra se deben pipetear 10 µl en la mezcla seca de cebadores específica respectivamente. Este procedimiento se efectúa mejor con una multipipeta pero hay que tener cuidado de que la punta de la pipeta no entre en contacto con los cebadores. Para evitar que los cebadores se contaminen se debe pipetear la mezcla maestra en la pared del tubo.
- (4) Cierre bien las tiras de PCR que incluyen tiras de capuchones/láminas. Coloque la placa en el termorregulador e inicie el proceso de PCR con el programa de HLA SSP.

5.4 Electroforesis de gel

El análisis de los productos PCR se realiza mediante la electroforesis de gel de agarosa y la subsiguiente detección de las bandas de ADN en luz ultravioleta.

5.4.1 Preparación de los reactivos

- **Buffer 5 x TBE** (0,445 M Tris-Borato, 0,0125 M EDTA):
54 g Tris(hidroximetil-) aminometano (base)
27,5 g Ácido bórico (H₃BO₃)
4,65 g Na₂EDTA
añada 1000 ml con agua destilada y almacénelo a temperatura ambiente
- **Solución de bromuro de etidio** (10 mg/ml)
Disuelva 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de agua destilada dH₂O y almacene la solución a una temperatura comprendida entre los 2...8° C evitando los rayos solares.
Cuidado: El bromuro de etidio es una sustancia mutágena y venenosa. Lleve guantes de protección cuando manipule el bromuro de etidio (incluso en modo diluido). En caso de que entre en contacto con la piel aclare inmediatamente con abundante agua.
- **Buffer 1 x TBE**
Dilución final 1:5 del buffer 5 x TBE en agua desmineralizada.

5.4.2 Realización

Se ha de elaborar un gel de agarosa al 2 %. Para ello hervir 5 g de agarosa en 250 ml TBE 1x hasta que se disuelva completamente. Agitar la solución para enfriarla a < 60°C y añadir 4 µl de solución de bromuro de etidio usando una pipeta. Seguidamente verter la solución de agarosa (exenta de burbujas) en el portagel

preparado y sellado. Utilizar peines (pocillos de 10 µl) y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos como mínimo.

Tras la gelificación de la agarosa, colocar el gel en la cámara para geles, quitar los peines y cubrir el gel con TBE 1x. Los pocillos del gel deben estar cubiertos totalmente con tampón. A continuación pipetear la totalidad del preparado de RCP (10 µl) en los pocillos del gel.

Para el control del tamaño de los productos RCP se recomienda utilizar un estándar de peso molecular adecuado (marcador de 50-1000 bp) para la electroforesis.

La electroforesis se realiza en 15 a 25 minutos a 8 V/cm (distancia entre electrodos). La distancia de migración del rojo cresol debe ser de 1-1,5 cm.

5.4.3 Documentación

Una vez finalizada la electroforesis, colocar el gel sobre un transiluminador ultravioleta y fotografiarlo para que los resultados puedan ser documentados e interpretados.

Atención: Utilizar una protección adecuada para la cara contra los rayos ultravioletas.

6. Resultados

6.1 Valoración

Las mezclas de cebadores Biotest HLA contienen cebadores de control que amplifican un fragmento de 1.069 bp de longitud de la hormona de crecimiento humano (human growth hormone, HGH). Estos cebadores no presentan una concentración tan alta como los pares de cebadores alelo- específicos y sirven para controlar que el proceso de PCR se desarrolle con éxito. Por regla general, la amplificación se efectúa siempre, es decir, tanto en presencia como en ausencia de un fragmento de PCR de alelo o grupo específico. Por lo general, la banda de control se puede observar, por lo tanto, en todos los precipitados de PCR. En presencia de un producto de PCR específico de HLA, la banda de control puede aparecer débilmente o incluso desaparecer por completo. Este fenómeno no supone ninguna limitación, ya que en estos casos el control del desarrollo de PCR viene reflejado por bandas específicas.

Para interpretar el ensayo se parte de la presencia o ausencia de una banda de ADN específica en el gel. El tamaño del fragmento de ADN amplificado no constituye un factor determinante pero se puede tener en cuenta como ayuda en la valoración del ensayo.

El patrón de bandas específicas se valora según el esquema de evaluación adjunto y se interpreta el resultado de la tipificación con ayuda del esquema de reacción.

Interpretación del gel

	Reacción positiva	Reacción positiva	Reacción negativa	Ninguna amplificación
Bolsa de gel				
Banda de control	Ninguna	-----		Ninguna
Banda específica			Ninguna	Ninguna
Banda de cebadores				

6.2 Limitaciones del procedimiento

1. La intensidad de las bandas puede variar en función de la calidad y la cantidad del ADN empleado. La cantidad del producto RCP corresponde a la intensidad de las bandas visibles mediante los rayos ultravioletas.
2. Si fallan 1 ó 2 amplificaciones RCP se deberá de comprobar si su valoración positiva conduce a un resultado de tipificación. Si fuera éste el caso, se deberá repetir el test. Si la valoración positiva de las amplificaciones ausentes no conduce a ningún resultado de tipificación y ha sido detectada claramente

la existencia de dos alelos, no se requieren otras medidas. Sin embargo, si se ha podido detectar solamente un alelo, el test deberá repetirse.

3. El empleo de ADN polimerasas Taq que no sean las recomendadas por PE Applied Biosystems puede causar errores, así como amplificaciones RCP no específicas falsamente positivas.
4. Los ensayos de ADN se deben utilizar inmediatamente después del aislamiento. No obstante, se puede llevar a cabo un almacenamiento prolongado (durante más de 1 año) a una temperatura de – 20°C.
5. Sólo se puede garantizar la exactitud de los resultados si se respetan estrictamente todas las instrucciones que se han mencionado en el presente documento.
6. Aplique este ensayo exclusivamente con el objetivo de determinar los antígenos HLA iniciales. Con la finalidad de asegurar un trasplante se debe recurrir a otros resultados clínicos y diagnósticos.
7. Mediante los juegos de tipificación Bio-Rad HLA SSP no se pueden diluir todas las combinaciones de alelos.

6.3 Controles de calidad

Las cargas de producción se revisan mediante un panel de ADN para controlar la calidad de cada uno de los pares de cebadores.

Se debe realizar un control de entrada de cargas mediante combinaciones de alelos heterocigóticos que abarquen el mayor número posible de mezclas de cebadores.

6.4 Caracterización específica

Con los equipos Bio-Rad SSP y otros kits SSP y SSO de venta en comercios se realizaron ensayos comparados con 167 sujetos de experimentación (receptores de trasplantes al azar y donantes potenciales procedentes de 2 zonas geográficas diferentes). Comparando los resultados del Bio-Rad SSP y los de los otros ensayos SSP y SSO se ha podido determinar una coincidencia del 100% (167/167).

	Coincidencias	No-Coincidencias	Total	%
N	167	0	167	100
%	100%	0%		

N = Número de ensayos

7. Búsqueda de errores

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCIÓN
No hay bandas visibles.	Falta de bromuro de etidio en el gel.	Tefir nuevamente el gel en el baño de tinte (tampón 1xTBE con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio).
Estándar MW visible. Productos RCP no visibles.	Preparación incorrecta de la RCP: no se añadió ADN o polimerasa Taq.	Repetir la preparación para la RCP.
	Condiciones inadecuadas de los ciclos de temperatura.	Comprobar el programa RCP en el termociclador. El programa indicado vale para los termocicladores recomendados: PE 9600, PE 9700. Termocicladores distintos a los recomendados deben ser validados por el usuario. Los termocicladores distintos a los recomendados pueden tener velocidades de calentamiento y enfriamiento diferentes. <u>Posibles variaciones del programa RCP:</u> Si se producen amplificaciones no específicas, se pueden establecer condiciones más rigurosas aumentando gradualmente 1° C la temperatura de hibridación. Al contrario, amplificaciones falsamente negativas pueden ser originadas por condiciones de RCP demasiado rigurosas. En este caso, se recomienda reducir gradualmente 1° C la temperatura de hibridación. Aumentar el tiempo de desnaturalización de 10 a 20 segundos. Aumentar el tiempo de extensión de 30 a 60 segundos.
Fallo de una o varias amplificaciones de RCP (bandas de control y muestras amplificadas específicas).		Si fallan 1 ó 2 amplificaciones RCP se deberá comprobar si su valoración positiva conduce a un resultado de tipificación. Si fuera éste el caso, se deberá repetir el test. Si la valoración positiva de las amplificaciones ausentes no conduce a ningún resultado de tipificación y ha sido detectada claramente la existencia de dos alelos, no se requieren otras medidas. Sin embargo, si se ha podido detectar un único alelo, el test deberá repetirse. Si fallan más de 2 amplificaciones RCP se deberá repetir el test.
Bandas poco específicas en el gel; ausencia de bandas de control o bandas de control muy débiles.	Se ha usado una cantidad insuficiente de ADN.	Doblar la cantidad de ADN (reducir dH ₂ O en el preparado); emplear aprox. 100 ng de ADN por preparado RCP.
	El preparado contiene inhibidores RCP como el etanol, la hemoglobina, la heparina o "beads".	Como material de base utilizar sangre recogida en probeta con ácido edético (EDTA) o citrato (tras lavar el sedimento de ADN con etanol, dejar secar bien).
	El pH de la solución de ADN es demasiado ácido (modificación cromática del cóctel RCP tras añadir el ADN).	Precipitar el ADN otra vez y diluir en agua dest.
	Condiciones inadecuadas de los ciclos de temperatura.	Véase arriba.
Bandas específicas débiles en el gel.	La concentración del ADN es excesiva.	Diluir el ADN; concentraciones demasiado elevadas del ADN o un ADN que no haya sido disuelto adecuadamente puede originar el fallo de las bandas específicas.
	Se ha diluido ADN en un tampón que contiene un inhibidor de la reacción RCP.	Precipitar el ADN otra vez y diluir en agua dest.
	Condiciones inadecuadas de los ciclos de temperatura.	Véase arriba.
Existencia de bandas de control, existencia de bandas específicas, pero existencia además de una o varias bandas no específicas débiles (reacciones falsamente positivas).	La concentración de ADN es demasiado elevada.	Diluir el ADN.
	Reacciones cruzadas con otros alelos.	Comprobar el esquema de evaluación.
	Insuficiente calidad del ADN o contaminación del ADN.	Aislar nuevamente el ADN.
Bandas en el preparado RCP del control negativo.	Por error se ha pipeteado ADN en el preparado de los controles negativos.	Eventualmente repetir la preparación o bien anotarlo en los documentos de evaluación.
	Contaminación de los reactivos	Sustituir los reactivos.

8. Literatur/ References/ Références bibliographiques/ Bibliografia/ Bibliografía

1. Graham DE (1978)
The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses.
Anal Biochem 85: 609-613
2. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988)
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucl Ac Res 16: 1215
3. Olerup O, Zetterquist H (1992)
HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation.
Tissue Antigens 39: 225-335.
4. Bunce M, O'Neill CM, Barnado MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI (1995)
Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)
Tissue Antigens 46:355-367.
5. Blasczyk R, Hahn U, Wehling J, Huhn D, Salama A (1995)
Complete subtyping of the HLA-A locus by sequence-specific amplification followed by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism analysis.
Tissue Antigens 46:86-95.