



# Instrucciones de uso

## *Olerup SSP*® sin *Taq* polimerasa

© 2023 CareDx, Inc. Todas las marcas de servicio o marcas comerciales son propiedad o tienen licencia de CareDx, Inc. o sus afiliados. Todos los derechos reservados.

Kits de tipificación de HLA 0415-LBL v05 Olerup SSP® sin Taq polimerasa

Para el *diagnóstico* in vitro

Revisado en septiembre de 2023



Página 1 de 30

## Para el diagnóstico *in vitro*

### APLICACIONES

Los kits de tipificación de HLA *Olerup SSP*® son equipos de diagnóstico cualitativo *in vitro* para la tipificación del ADN de los alelos HLA de clase I y de clase II. Los productos se utilizan en centros médicos por profesionales experimentados para determinar el fenotipo HLA. El material original que se analiza es el ADN.

### RESUMEN Y DESCRIPCIÓN

Normalmente, los antígenos leucocitarios humanos (HLA) se determinaban mediante la prueba de linfocitotoxicidad. Sin embargo, esta prueba ha sido sustituida por las técnicas de tipificación del ADN basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a causa de su tasa de error y la falta de resolución a nivel de alelo. En la mayoría de las técnicas basadas en PCR, el proceso de PCR se utiliza únicamente como fase de amplificación del ADN diana y se requiere una fase de postamplificación para hacer distinciones entre los diferentes alelos. Por el contrario, en la metodología PCR-SSP (sequence-specific primer, SSP [cebador específico de secuencia]), la distinción entre los diferentes alelos se produce durante el proceso de PCR. Así se acorta y se simplifica la fase de postamplificación hasta una fase simple de detección mediante electroforesis en gel. Los resultados de la prueba SSP pueden ser positivos o negativos, con lo cual se elimina la necesidad de interpretación complicada de los resultados. Además, la resolución de tipificación de la PCR-SSP es mayor que la de otras técnicas de tipificación basadas en PCR, ya que cada par de cebadores define dos motivos secuenciales ubicados en *cis*, es decir, en el mismo cromosoma. Además, por la naturaleza sintética de los reactivos SSP, se ha mejorado la estabilidad y se ha reducido la variación entre lotes.

### PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

La metodología PCR-SSP se basa en el principio de que los cebadores oligonucleótidos, totalmente o casi totalmente apareados sin malapareamientos del extremo 3', se utilizan de forma más eficaz en la PCR que los cebadores mal apareados a través de polimerasas de ADN termoestables sin propiedades correctoras. Los pares de cebadores están diseñados para aparearse con alelos simples o grupos de alelos, según el grado de resolución requerido para la tipificación. Con condiciones de PCR estrictamente controladas, los pares de cebadores apareados o casi totalmente apareados permiten que se produzca la amplificación, es decir, un resultado positivo, mientras los pares de cebadores no apareados no permiten que se produzca la amplificación, es decir, un resultado negativo.

Después del proceso de PCR, los fragmentos de ADN amplificado se separan por tamaños, por ejemplo, por electroforesis en gel de agarosa, se visualizan por tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta, se documentan por fotografía y se interpretan. La interpretación de los resultados de PCR-SSP se basa en la presencia o ausencia de productos de PCR específicos. Los tamaños relativos de los productos de PCR específicos pueden ser útiles para la interpretación de los resultados. La metodología PCR-SSP para HLA la describió por primera vez O. Olerup en 1991 y 1992<sup>1,2</sup>.

Como el proceso de PCR puede verse afectado negativamente por varios factores (por ejemplo, errores de pipeteado, concentración de ADN demasiado baja, mala calidad del ADN, presencia de inhibidores de la PCR, inexactitud del termociclador), se incluye un par de cebadores de control positivo interno en cada reacción de PCR<sup>2</sup>. El par de cebadores de control positivo interno aparean regiones conservadas del gen de la hormona de crecimiento humano, que se encuentra en todas las muestras de ADN humano. Si hay un producto de PCR específico de algún alelo de HLA, es posible que el producto de la banda de control positivo interno sea débil o no esté presente. Los amplicones generados por los pares de cebadores de HLA específicos son más cortos que los amplicones del par de cebadores de control positivo interno, aunque más largos que los cebadores no incorporados (véase *Valores previstos*).

## REACTIVOS

### A. Identificación

Los kits de tipificación *Olerup SSP*® contienen cebadores específicos de secuencia, optimizados previamente y secos para la amplificación por PCR de alelos HLA y del gen de la hormona de crecimiento humano, mezcla maestra de PCR sin *Taq* polimerasa ("mezcla maestra") y sellados adhesivos de PCR.

Las soluciones del cebador se preparan previamente en alícuotas y se secan en pocillos de 0,2 mL de placas de PCR de paredes finas y cortadas. Cada pocillo de la placa contiene una solución de cebador seca compuesta por una mezcla específica de cebadores: cebadores de HLA específicos de grupos y alelos, así como un par de cebadores de control positivo interno apareados con secuencias no alélicas listos para la adición de la muestra de ADN, la mezcla maestra y H<sub>2</sub>O.

Los cebadores están diseñados para una amplificación de PCR óptima al utilizar la mezcla maestra y el programa del termociclador de ADN recomendado (véase *Programación del termociclador*).

Las tablas de especificidad e interpretación específicas del lote o la hoja de trabajo para los alelos HLA específicos amplificados por cada mezcla de imprimación se pueden recuperar de la página web [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

### B. Advertencias y precauciones

1. Para el diagnóstico *in vitro*.
2. Este producto no puede utilizarse como única base para tomar una decisión clínica.
3. **Advertencia de peligro biológico**: todos los productos sanguíneos deben tratarse como potencialmente infecciosos. Ningún método de prueba conocido puede ofrecer garantías de que los productos derivados de la sangre humana no transmiten agentes infecciosos.
4. **Advertencia de peligro biológico**: el bromuro de etidio utilizado para la tinción del ADN en la electroforesis en gel de agarosa es cancerígeno. Manipúlelo con un equipo de protección personal adecuado.
5. **Precaución**: utilice protección para los ojos contra UV y no mire directamente a la fuente de luz UV cuando examine o fotografíe geles.

6. Las pipetas y otros equipos utilizados para las manipulaciones **posteriores** a PCR **no** deben utilizarse para manipulaciones **previas** a PCR.
7. Para obtener más información, consulte la ficha de datos de seguridad del material ([www.caredx.com](http://www.caredx.com)).

**C. Instrucciones de uso**

Consulte más adelante el apartado *Instrucciones de uso*.

**D. Instrucciones de almacenamiento**

Almacene los componentes del kit en un lugar oscuro y a las temperaturas indicadas en las etiquetas de los envases.

Utilícelos antes de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de los envases.

**E. Purificación o tratamiento requerido para el uso**

Consulte más adelante el apartado *Instrucciones de uso*.

**F. Indicaciones de inestabilidad**

1. No utilice placas de cebadores con fisuras en las paredes o daños en el borde superior de los pocillos, ya que esto podría generar evaporación durante la amplificación por PCR. No utilice tiras de tapones PCR con fisuras, ya que esto podría generar evaporación durante la amplificación por PCR.
2. Los *pellets* de los pocillos deben ser rojos. Si hay una decoloración amarillenta en el *pellet*, puede indicar degradación.
3. La mezcla maestra debe ser de un color entre rojo y púrpura. Si hay una decoloración entre amarillo y naranja, puede indicar degradación.

## REQUISITOS DE LOS INSTRUMENTOS

### A. Instrumento

Debe utilizarse un termociclador con las especificaciones mínimas siguientes:

- Tapa térmica con una temperatura de 104 °C para una operación sin aceite.
  - Bloque de muestras (aluminio, plata o plata bañada en oro) para utilizarse con una placa de PCR de 96 pocillos o tubos de reacción de paredes finas de 0,2 mL.
  - Los kits de *Olerup SSP* se validan con los termocicladores siguientes.  
Tasas de incremento de temperatura recomendadas:
    - GeneAmp 9700: Termociclador GeneAmp 9700 en modo 9600. Esto corresponde a una **tasa de incremento de temperatura de muestreo** de 1,6 °C/s en aumento y 0,8 °C/s en disminución. ProFlex 1x96-well block: Termociclador
    - ProFlex PCR con una tasa de incremento de temperatura de bloqueo de 3,0 °C/s (3,0 °C/s en cada paso). Una **tasa de incremento de temperatura de bloqueo** de 3,0 °C/s corresponde a una tasa de incremento de temperatura de muestreo de 1,52 °C/s en aumento y 1,36 °C/s en disminución. ProFlex 2x96-well block: Termociclador
    - ProFlex PCR con una tasa de incremento de temperatura de bloqueo de 3,0 °C/s (3,0 °C/s en cada paso). Una **tasa de incremento de temperatura de bloqueo** de 3,0 °C/s corresponde a una tasa de incremento de temperatura de muestreo de 1,9 °C/s en aumento y 1,6 °C/s en disminución.
- Nota: Elevadas tasas de incremento de temperatura, mayores que las descritas anteriormente, pueden afectar a los resultados de la tipificación. Tenga en cuenta que los efectos sobre la tipificación pueden variar entre termocicladores no validados según la configuración.***
- Intervalo de temperatura de 4,0 °C a 99,9 °C.
  - Precisión de temperatura de  $\pm 0,25$  °C en el intervalo de 35 °C a 99,9 °C.
  - Uniformidad de temperatura del bloque de muestras  $\leq 0,75$  °C en el intervalo de 55 °C a 95 °C.
  - Calibración de la temperatura según un estándar de referencia (NIST).

Programa el termociclador según los parámetros del termociclador de PCR que se describen a continuación, en el apartado B.

Si desea obtener información específica del termociclador, consulte el manual de instrucciones del fabricante. Los termocicladores deben calibrarse de acuerdo con las normas de acreditación ASHI (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) o EFI (European Federation of Immunogenetics).

Programa el termociclador antes de abordar las instrucciones de uso que se describen más abajo.

**B. Parámetros del termociclador de PCR**

- |    |           |       |       |                         |
|----|-----------|-------|-------|-------------------------|
| 1. | 1 ciclo   | 94 °C | 2 min | desnaturalización       |
| 2. | 10 ciclos | 94 °C | 10 s  | desnaturalización       |
|    |           | 65 °C | 60 s  | hibridación y extensión |
| 3. | 20 ciclos | 94 °C | 10 s  | desnaturalización       |
|    |           | 61 °C | 50 s  | hibridación             |
|    |           | 72 °C | 30 s  | extensión               |
| 4. | Final –   |       |       |                         |
|    | mantener  | TA    |       | si son menos de 8 horas |
|    |           | 4 °C  |       | si son más de 8 horas   |

Volumen de reacción total en cada pocillo, 10 µL.

Para todos los kits *Olerup SSP*® se utilizan los mismos parámetros de termociclador de PCR.

## RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Para tipificaciones SSP se necesita ADN extraído de alta pureza. Las muestras de ADN que se utilizarán para la tipificación de HLA por PCR-SSP deben volver a suspenderse en dH<sub>2</sub>O. La relación  $A_{260/280}$  debe ser de 1,6-2,0 por espectrofotometría UV para una visualización óptima de la banda durante la electroforesis.

Recomendamos la extracción de ADN automática con el sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN. Como material de inicio debe utilizarse sangre en ACD.

Como alternativa, el ADN puede extraerse mediante cualquier método por el cual se obtenga ADN puro. Si utiliza métodos alternativos, la concentración de ADN debe ajustarse a 30 ng/μL. **No utilice sangre heparinizada con estos métodos.**

Concentración de ADN recomendada:

Si se utiliza ADN extraído por EZ1, 15 ng/μL.

Si se utiliza ADN extraído por otros métodos,  
30 ng/μL.

Las concentraciones que superen los 50 ng/μL aumentarán el riesgo de amplificaciones no específicas y bandas adicionales débiles, especialmente para tipificaciones SSP de alta resolución de HLA de clase I. En caso necesario, diluya el ADN extraído en dH<sub>2</sub>O.

**Las muestras de ADN no deben volver a suspenderse en soluciones que contengan agentes quelantes como EDTA, con una concentración superior a 0,5 mM.**

Las muestras de ADN pueden utilizarse inmediatamente después de la extracción o almacenarse a +4 °C durante un máximo de 2 semanas sin que se produzcan efectos adversos en los resultados. Las muestras de ADN pueden conservarse a -20 °C o menos durante 9 meses. Antes de la tipificación de HLA, si las muestras de ADN extraído se han conservado durante un periodo largo deberá analizarse su pureza y concentración para comprobar si son aceptables.

Las muestras de ADN deben transportarse a +4 °C o menos para conservar su integridad durante el envío.

**PROCEDIMIENTO****A. Materiales provistos**

1. Placas de cebadores *Olerup SSP*®.
2. Mezcla maestra (volumen adecuado para las placas del kit). Para todos los kits *Olerup SSP*® se utiliza la misma mezcla maestra.
3. Sellados adhesivos de PCR (cantidad adecuada para las placas del kit).

**B. Materiales necesarios, pero no provistos**

1. Kit/equipo de aislamiento de ADN.
2. Espectrofotómetro UV.
3. Dispositivos de pipeteado. Recomendamos un dispensador electrónico de un canal que pueda dispensar alícuotas de 10 µL para añadir la mezcla de ADN-mezcla maestra-dH<sub>2</sub>O en los pocillos de la placa.
4. Puntas de pipetas desechables.
5. Tubos de polipropileno.
6. Mezclador de vórtice.
7. Microcentrífuga.
8. Gradillas de placas PCR.
9. Termociclador con tapa térmica para PCR con formato para 96 pocillos, un gradiente de temperatura en todo el bloque calefactor ≤ 0,75 °C y placa/retenedor para pocillos de reacción de paredes finas de 0,2 mL.
10. Horno microondas o placa caliente para calentar soluciones con agarosa.
11. Agarosa para electroforesis, como Seakem LE (FMC).
12. 0,5 x tampón de TBE; 1 x tampón de TBE es de 89 mM tris-borato, 2 mM de EDTA disódico, pH 8,0.
13. Frasco cuentagotas de bromuro de etidio n.º de producto 103.301-10 o frasco cuentagotas GelRed n.º de producto 103.302-05.
14. Dispositivo de pipeteado de carga de gel. Recomendamos una pipeta de 8 canales para la carga de gel, con un volumen ajustable de 5-25 µL.
15. Marcador de peso molecular de ADN para cubrir un rango de 50-1000 pb, p. ej., escalera de 100 pares de bases, n.º de producto de marcador de tamaño de ADN 103.202-100 o marcador de peso molecular de ADN para tiradas de gel cortas 103.203-100.
16. Equipo de electroforesis/alimentación eléctrica.
17. Transiluminador UV.
18. Sistema de documentación de imágenes o fotográfico.
19. *Taq* ADN polimerasa de Roche, grado GMP [n.º de catálogo: 03 734 927 001 (1000 U) o 03 734 935 001 (5000 U)].

**C. Procedimiento paso a paso**

Consulte más adelante el apartado *Instrucciones de uso*.



**INSTRUCCIONES DE USO****A. Preparación de la muestra**

1. Purifique el ADN genómico de la muestra de leucocitos por el método elegido. Consulte *Recogida y preparación de muestras* más arriba.
2. Si desea obtener información específica sobre la preparación y conservación de muestras, consulte *Recogida y preparación de muestras* más arriba.
3. Realice la amplificación por PCR en una muestra de ADN purificada utilizando una placa de tipificación *Olerup SSP*®, o guarde la muestra de ADN hasta que esté lista para la tipificación.

**B. Preparación del reactivo/equipo**

1. Programe un termociclador para que lleve a cabo el programa PCR de *Olerup SSP*®; consulte *Requisitos de los instrumentos – Parámetros de termociclador de PCR* más arriba.
2. Tenga *Taq* polimerasa disponible (5 unidades/μL), almacenada a -20 °C.
3. Prepare el gel para la electroforesis; consulte el apartado C **Preparación de la electroforesis en gel** más abajo.

**C. Preparación de la electroforesis en gel**

Para *Olerup SSP*® Gel System 96 (n.º de producto 103.101-01).

1. Instalación
  - Nivele la cubeta para 1 gel (n.º de producto 103.101-31) o la cubeta para 3 geles (n.º de producto 103.101-33) mediante la burbuja de nivelación y las patas ajustables de tres alturas.
  - Coloque las placas de gel en la cubeta.
2. Preparación del gel de agarosa al 2% (peso/volumen)

Utilice una agarosa para electroforesis de alta calidad, capaz de resolver 50-2000 fragmentos de pares de bases de ADN.

  - Al tampón de 5 mL de 10 x TBE (tris-borato EDTA), añada 150 mL de agua destilada y 2 g de agarosa en un frasco de vidrio de 500 mL.
  - Disuelva la agarosa hirviéndola en un horno microondas hasta que se forme una solución homogénea de 100 mL.
  - Deje que la solución del gel diluido se enfríe a 60 °C, p. ej., en un armario térmico.
  - Tiña el gel antes del colado con bromuro de etidio (10 mg/mL), 5 μL por 100 mL de solución de gel. Para manipularlo con la máxima comodidad, utilice nuestros frascos cuentagotas de bromuro de etidio (n.º de producto 103.301-10). **Nota: el bromuro de etidio es cancerígeno. Manipúlelo con un equipo de protección personal adecuado.**
  - Vierta 100 mL de solución de gel en la placa de gel de la cubeta. Coloque 6 peines de gel (n.º de producto 103.101-21) en las ranuras de la placa de gel.
  - Deje que el gel se solidifique durante 15 minutos.
  - Vierta 750 mL de tampón de 0,5 x TBE en el depósito de gel. Sumerja la placa de gel en la caja de gel y extraiga con cuidado los 6 peines de gel hacia arriba.

Si utiliza sistemas de electroforesis alternativos, siga las instrucciones del fabricante. Para utilizarlos con los kits de tipificación de HLA *Olerup SSP*®, estos sistemas deben poder resolver productos de PCR en un intervalo de 50 a 1100 pares de base de tamaño.

**D. Procedimiento paso a paso**

1. Retire de las temperaturas de almacenamiento indicadas: la cantidad adecuada de muestras de ADN, las placas de cebadores, el volumen de mezcla maestra y la cantidad de *Taq* polimerasa (5 unidades/ $\mu$ L) necesaria para las muestras de ADN o las placas de cebadores seleccionadas. Descongélelas a temperatura ambiente (entre 20 y 25 °C).

Para todos los kits *Olerup SSP*® se utiliza la misma mezcla maestra.

2. Mezcle brevemente las muestras de ADN por vórtice.
3. Coloque las placas de cebadores en una gradilla de placas PCR.
4. **Kits de alta y baja resolución**
  - Agite en vórtice la mezcla maestra antes de tomar alícuotas.
  - Utilice una pipeta manual de un canal, añada a temperatura ambiente la mezcla maestra y *Taq* polimerasa (5 unidades/ $\mu$ L) y dH<sub>2</sub>O en un tubo de 0,5 mL o 1,5 mL. (Consulte más abajo en la tabla 1 las cantidades adecuadas.)
  - Tape el tubo y agítelo en vórtice durante 5 segundos. Pulse y gire el tubo en una microcentrífuga para que baje todo el líquido de las paredes del tubo.
  - Utilizando una pipeta manual de un canal, añada 8  $\mu$ L de la mezcla de mezcla maestra y dH<sub>2</sub>O y 2  $\mu$ L de dH<sub>2</sub>O en el pocillo de control negativo, es decir, el pocillo con los pares de cebadores de control negativo de la placa de cebadores.
  - Utilizando una pipeta manual de un canal, añada la muestra de ADN a temperatura ambiente al resto de mezcla maestra y dH<sub>2</sub>O. (Consulte más abajo en la tabla 1 las cantidades adecuadas.)
  - Tape el tubo y agítelo en vórtice durante 5 segundos. Pulse y gire el tubo en una microcentrífuga para que baje todo el líquido de las paredes del tubo.
  - Utilizando un dispensador electrónico de un canal, introduzca alícuotas de 10  $\mu$ L de la muestra de mezcla de reacción en cada pocillo, excepto en el pocillo de control negativo de la placa de cebadores.

**Tabla 1: volúmenes de los componentes necesarios por prueba para varios números de pocillos al utilizar una mezcla maestra sin Taq polimerasa.**

N.º de pocillos por prueba	Volumen de mezcla maestra (µL)	Volumen de muestra de ADN (µL)	Volumen de dH <sub>2</sub> O (µL)	Volumen de Taq polimerasa (µL)	N.º de pocillos por prueba	Volumen de mezcla maestra (µL)	Volumen de muestra de ADN (µL)	Volumen de dH <sub>2</sub> O (µL)	Volumen de Taq polimerasa (µL)
2	12	8	19,7	0,3	25	87	58	142,7	2,3
3	15	10	24,6	0,4	26	90	60	147,6	2,4
4	18	12	29,5	0,5	27	93	62	152,5	2,5
5	21	14	34,4	0,6	28	96	64	157,4	2,6
6	24	16	39,4	0,6	29	99	66	162,4	2,6
7	27	18	44,2	0,8	30	102	68	167,3	2,7
8	30	20	49,2	0,8	31	105	70	172,2	2,8
9	33	22	54,1	0,9	32	108	72	177,1	2,9
10	36	24	59	1,0	36	126	84	206,6	3,4
11	39	26	63,9	1,1	40	138	92	226,3	3,7
12	42	28	68,9	1,1	44	150	100	246	4,0
13	45	30	73,8	1,2	48	162	108	265,7	4,3
14	48	32	78,7	1,3	52	174	116	285,4	4,6
15	51	34	83,6	1,4	56	186	124	305	5,0
16	54	36	88,6	1,4	60	198	132	324,7	5,3
17	60	40	98,4	1,6	64	210	140	344,4	5,6
18	63	42	103,3	1,7	68	228	152	373,9	6,1
19	66	44	108,2	1,8	72	240	160	393,6	6,4
20	69	46	113,2	1,8	76	252	168	413,3	6,7
21	72	48	118,1	1,9	80	264	176	433	7,0
22	75	50	123	2,0	84	276	184	452,6	7,4
23	78	52	127,9	2,1	88	288	192	472,3	7,7
24	81	54	132,8	2,2	92	300	200	492	8,0
					96	312	208	511,7	8,3

Los volúmenes recomendados de la lista anterior incluyen el volumen para compensar las variaciones de pipetas y para pérdidas de líquido dentro de las paredes de los tubos.

### 5. Kits Combi A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ y DQA-DQB-DR mejorado y el kit para alelos frecuentes de alta resolución HLA-C

- Agite en vórtice la mezcla maestra.
- Utilizando una pipeta manual de un canal, añada a temperatura ambiente 8,3 µL de Taq polimerasa (5 unidades/µL) y 511,7 µL de dH<sub>2</sub>O en el tubo de 1,5 mL provisto que contiene 312 µL de mezcla maestra.
- Tape el tubo y agítelo en vórtice durante 5 segundos. Pulse y gire el tubo en una microcentrífuga para que baje todo el líquido de las paredes del tubo.
- Utilizando una pipeta manual de un canal, añada 8 µL de la mezcla de mezcla maestra (Taq polimerasa) y dH<sub>2</sub>O y 2 µL de dH<sub>2</sub>O en el pocillo de control negativo n.º 96, es decir, el pocillo con los pares de cebadores de control negativo.
- Utilizando una pipeta manual de un canal, añada una muestra de ADN de 206 µL a temperatura ambiente en la mezcla restante de mezcla maestra (Taq polimerasa) y dH<sub>2</sub>O.

**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA *Olerup SSP*® sin *Taq* polimerasa**

- Tape el tubo y agítelo en vórtice durante 5 segundos. Pulse y gire el tubo en una microcentrífuga para que baje todo el líquido de las paredes del tubo.
- Utilizando un dispensador electrónico de un canal, introduzca alícuotas de 10 µL de la muestra de mezcla de reacción en cada pocillo, excepto en el pocillo de control negativo n.º 96 de la placa de cebadores.

**Importante:**

Asegúrese de aplicar a la muestra anterior los cebadores (secados en el fondo de cada pocillo de la placa de cebadores) para evitar la contaminación cruzada entre pocillos. Toque la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta para permitir que la muestra se deslice hasta el fondo del pocillo. Compruebe que todas las muestras han caído hasta el fondo de cada pocillo. Si no es así, toque suavemente la placa en la parte superior del banco para que todas las muestras se depositen en el fondo del pocillo antes de iniciar la PCR.

5. Cubra las placas de cebadores con los sellados adhesivos de PCR provistos. Compruebe que todos los pocillos de reacción queden totalmente cubiertos para evitar la pérdida por evaporación durante la amplificación por PCR. Puede aplicarse la almohadilla de compresión *Olerup SSP*® (n.º de producto 103.505-06) encima de los sellados adhesivos de PCR para evitar la evaporación durante el termociclado.
6. Coloque las placas de cebadores en el termociclador con un adaptador adecuado entre tubo y placa. No deje que pasen más de 5 minutos entre la instalación de PCR y el termociclado.
7. Introduzca el número de programa de *Olerup SSP*®. Especifique un volumen de reacción de 10 µL.
8. Inicie el programa PCR. El programa dura aproximadamente 1 hora y 20 minutos.
9. Extraiga las placas de cebadores del termociclador. Examine la placa de PCR para asegurarse de que hay aproximadamente el mismo volumen de líquido en cada pocillo de PCR. Someta a electroforesis las muestras; consulte más abajo el apartado E, *Electroforesis en gel*. Interprete los resultados de tipificación con las **tablas de especificidad e interpretación específicas del lote o la hoja de trabajo**; consulte *Valores previstos* más abajo.

## E. Electroforesis en gel

1. Una vez completada la reacción PCR, disponga la placa de cebadores y la cubeta de gel. El orden de los pocillos va de izquierda a derecha y de arriba abajo.
2. Retire con cuidado el sellado PCR sin salpicar los productos de PCR.
3. Cargue los productos de PCR en la secuencia para el gel de agarosa al 2%. (No es necesario añadir tampón de carga de gel.) Para la carga del gel se recomienda utilizar una pipeta de 8 canales.
4. Cargue un marcador de peso molecular de ADN (escalera de 100 pares de bases, n.º de producto del marcador de peso molecular de ADN 103.202-100 o del marcador de peso molecular de ADN para tiradas de gel cortas 103.203-100) en un pocillo por fila.
5. Tape la caja de gel con su tapa.
6. Someta al gel a electroforesis en tampón de 0,5 x TBE, sin recirculación del tampón, durante 15-20 minutos a 8-10 V/cm.
7. Pase la placa de gel con gel a un transiluminador UV.
8. Fotográfíe el gel con o sin la placa de gel.
9. Marque la fotografía según las normas del laboratorio.

## CONTROL DE CALIDAD

Las directrices ASHI para la prueba de HLA indican que debe incluirse un pocillo de control negativo (contaminación) en cada instalación de PCR. (Normas revisadas para laboratorios acreditados, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, normas revisadas definitivas aprobadas por CMS: 16 de febrero de 2021). Se incluye un pocillo de control negativo en todos los kits, con la excepción de la dosis unitaria HLA-B\*27 y los kits de pocillo individual HLA-B\*27.

Consulte *Interpretación del gel* en la página 14.

## RESULTADOS

Se puede acceder a las hojas de validación de líneas celulares específicas del lote y al certificado de análisis en línea, [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El proceso PCR-SSP requiere condiciones de prueba altamente controladas para garantizar una amplificación discriminatoria adecuada. Debe seguirse estrictamente el procedimiento descrito en *Instrucciones de uso*.
2. La muestra de ADN extraído es el patrón para el proceso de amplificación por PCR específico. El ADN purificado debe tener una relación  $A_{260/280}$  entre 1,6 y 2,0 para obtener una visualización óptima de las bandas por electroforesis.
3. Todos los instrumentos, como el termociclador, dispositivos de pipeteado, etc., deben calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
4. En el prospecto del producto se proporciona información específica del lote: *Información específica del lote*, y en la hoja de trabajo específica del lote.
5. Basándose en la prueba realizada, se evaluaron las sustancias siguientes con tres (3) métodos de extracción a las concentraciones de la lista y no influyeron en la realización de la prueba.

**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA Olerup SSP® sin Taq polimerasa**

<b>Método de extracción</b>	<b>Sustancias que interfieren</b>	<b>Concentración de interferencia*</b>
Sistema EZ1 DSP DNA Blood	Bilirrubina	200 mg/L
	Hemoglobina	200 g/L
	Triglicéridos	30 g/L
	Proteínas	110 g/L
Kit QIAamp DSP DNA Blood	Bilirrubina	200 mg/L
	Hemoglobina	200 g/L
	Triglicéridos	18,2 g/L
	Proteínas	77 - 96 g/L
Método Gentra PureGene	Bilirrubina	200 mg/L
	Hemoglobina	200 g/L
	Triglicéridos	18,2 g/L
	Proteínas	119-146 g/L

**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA Olerup SSP® sin Taq polimerasa**

6. Las placas de PCR son físicamente compatibles con la mayoría de los termocicladores del mercado. Consulte la tabla siguiente de compatibilidad plástica de los termocicladores.

*Nota: La tabla pretende ser solamente una guía. Para consultar los termocicladores validados, véase la sección Requisitos del instrumento – Instrumento.*

<b>Tabla de compatibilidad</b>	
<b>Fabricante</b>	<b>Termociclador</b>
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-well
	ProFlex 2x96-well
	Veriti 0,2 mL 96-well Block
Agilent (Stratagene)	GeneAmp 2700, 2720, 9600
	SureCycler 8800
	RoboCycler
Biometra	Gradient Cycler
	Uno, Uno II
	T1 Thermocycler
	TGradient/TAdvanced
Bio-Rad	TRobot
	TProfessional
	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
	C1000, S1000
Eppendorf	PTC-2(xx)
	PTC-100 with 96-well block
	Mastercycler Gradient
MWG	Mastercycler EP Gradient, Pro, Nexus
	Primus 96
Thermo Scientific	TheQ Lifecycler
	Arktik
	Flexigene, TC-412, TC-4000
	Genius, Touchgene, TC-512, TC-5000
Thermo Scientific Hybaid	TC-PLUS, Prime, PrimeG, Prime Elite
	PCR Express, Px2, PxE
	MultiBlock System & MBS
Gene Technologies	Omnigene, Omn-E
	GS1, GS4, GSX
Takara	TP 3000

7. El funcionamiento de este kit con la mezcla maestra sin Taq polimerasa solo se ha aprobado con Taq ADN polimerasa de Roche, grado GMP (n.º de catálogo: 03 734 927 001 o 03 734 935 001). Se desconoce el rendimiento en ensayos con cualquier otra enzima, y debe establecerse y aprobarse por parte del usuario.










**VALORES PREVISTOS****A. Análisis de los datos**

Examine meticulosamente la fotografía del gel y determine los carriles positivos.

1. Si se amplificaron alelos de HLA específicos, en un carril de gel se observará una banda más corta y de migración más rápida. Esto indica un resultado de la prueba positivo.
  - a. Registre la presencia y la ausencia de productos de PCR específicos.
  - b. Es útil monitorizar las longitudes correspondientes de los productos de PCR específicos según los prospectos de los productos específicos del lote al interpretar los resultados del gel. Varios carriles tienen dos o más longitudes posibles de productos de PCR específicos. Estos pocillos contienen varios pares de cebadores que generan productos de PCR de varios tamaños según los alelos de HLA de la muestra de ADN.
  - c. Haga corresponder el patrón de carriles de gel con productos de PCR específicos con la información de las tablas de especificidad e interpretación específicas del lote para obtener la tipificación de HLA de la muestra de ADN.
2. Debe ver una banda de control positivo interno, de migración más lenta y más larga, en todos los carriles de gel excepto en el carril de gel de control negativo, como un control de una amplificación correcta. Es posible que la banda de control positivo interno sea débil o no se encuentre en los carriles de gel positivos.
  - a. Registre la presencia y las longitudes correspondientes de las bandas de control positivo interno. Las bandas de control de diferentes tamaños ayudarán en la orientación correcta de la tipificación, así como en la identificación de kits.
  - b. La ausencia de banda de control positivo interno sin un producto de PCR específico indica una reacción PCR fallida.
    - i. Si pueden determinarse alelos de HLA en presencia de reacciones PCR fallidas y estas no cambian la asignación de los alelos, no será necesario repetir la prueba.
    - ii. Si, no obstante, las reacciones PCR fallidas pueden cambiar la asignación de alelos de HLA, deberá repetirse la tipificación.
3. La presencia de productos de PCR específicos o banda de control positivo interno en los carriles de control negativo indica la contaminación con productos de PCR e invalida todos los resultados de la prueba. En los carriles de control negativo pueden observarse oligómeros de cebadores con un tamaño entre 40 y 60 pares de bases. Esto no constituye una contaminación.



## B. Interpretación del gel

	<b>Reacción positiva</b>	<b>Reacción negativa</b>	<b>Fallo en la reacción PCR</b>
Pocillo			
Banda de control positivo interno			
Banda específica			
Banda del cebador			

1. Debe hacerse pasar un marcador de peso molecular de ADN (escalera de 100 pares de bases, n.º de producto del marcador de peso molecular de ADN 103.202-100 o del marcador de peso molecular de ADN para tiradas de gel cortas 103.203-100) en un pocillo por fila del gel o siguiendo las directrices de acreditación del laboratorio local.
2. Pueden obtenerse bandas más largas que la banda de control positivo interno y estas deben descartarse en la interpretación de los resultados de tipificación.
3. Los cebadores no utilizados formarán una banda difusa más corta que 50 pares de bases.
4. Pueden observarse artefactos de oligómeros en los cebadores. Estos son más largos que la banda del cebador, aunque más cortos que las bandas específicas.

## CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL FUNCIONAMIENTO

### Control de calidad del lote del kit

Cada solución de cebadores se prueba en comparación con un panel de 48 muestras de ADN de líneas celulares caracterizadas en pocillos del IHWC; consulte las hojas de validación de líneas celulares específicas del lote en el prospecto del producto, información específica del lote.

### Comparación de métodos

Se llevó a cabo un estudio para comparar los kits de tipificación de HLA Olerup SSP® con y sin Taq polimerasa proporcionados en la mezcla maestra de PCR. El objetivo del estudio era demostrar que la adición manual no afecta a los resultados del ensayo

**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA Olerup SSP® sin Taq polimerasa**

y que se obtienen los mismos resultados con diferentes lotes de *Taq* polimerasa. El estudio incluyó la tipificación de baja resolución de HLA-A, HLA-B (clase I) y HLA-DRB (clase II) de 15 muestras de ADN con genotipo HLA conocido obtenidas durante la recogida del Taller Internacional de Histocompatibilidad. Las muestras fueron preparadas y codificadas por personas distintas a las encargadas de llevar a cabo las pruebas, quienes no conocían los tipos de HLA de las muestras. Cada muestra se probó paralelamente con el kit de placa Combi Olerup SSP® HLA-A-B-DR con mezcla maestra de PCR sin *Taq* polimerasa (“prueba”), y con el kit de placa Combi Olerup SSP® HLA-A-B-DR con mezcla maestra de PCR con *Taq* polimerasa (“control”), de acuerdo con las instrucciones del prospecto del producto de cada ensayo. Todas las pruebas se realizaron en el laboratorio de CareDx AB en Estocolmo (Suecia), con un lote del kit y dos lotes de *Taq* polimerasa. En el estudio se utilizó *Taq* ADN polimerasa, grado GMP, de Roche. Las pruebas de cada muestra consistían en la tipificación de baja resolución con el kit de placa Combi Olerup SSP® HLA-A-B-DR con: 1) mezcla maestra de PCR con *Taq* polimerasa (ensayo autorizado por la FDA; ensayo de control); 2) mezcla maestra de PCR con 5 U/μL de *Taq* ADN polimerasa, grado GMP, de Roche; lote n.º 1 (lote de prueba n.º 1), y 3) mezcla maestra de PCR con 5 U/μL de *Taq* ADN polimerasa, grado GMP, de Roche; lote n.º 2 (lote de prueba n.º 2). Después del proceso de PCR, se llevó a cabo una fase de detección mediante electroforesis en gel. A continuación se detallan los resultados.

Comparación	Concordancia			% concordancia (intervalo de confianza del 95% <sup>a</sup> )
	Resultados de tipificación de la clase I (n.º de concordancias/total)		Resultados de tipificación de la clase II (n.º de concordancias/total)	
	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB	
Lote de prueba n.º 1 / Lote de control	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Lote de prueba n.º 1 / Concordancia <sup>b</sup>	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Lote de prueba n.º 2 / Lote de control	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Lote de prueba n.º 2 / Concordancia	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Lote de prueba n.º 1 / Lote de prueba n.º 2	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)

<sup>a</sup> Método de puntuación

<sup>b</sup> Resultados de concordancia de la recogida durante el Taller Internacional de Histocompatibilidad

## BIBLIOGRAFÍA

1. Olerup O, Zetterquist H. *HLA-DRB1\*01* subtyping by allele-specific PCR-amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991; **37**: 197-204.
2. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens* 1992; **39**: 225-235.
3. Los alelos HLA actuales se encuentran en [www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)

## RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Motivo	Acción
<b>No hay amplificación (ni amplificación de los fragmentos de control interno ni amplificaciones específicas).</b>	Poca cantidad de ADN.	Mida la concentración de ADN y compruebe si la cantidad añadida es correcta. La contaminación del ARN puede provocar una sobrestimación espectrofotométrica de la concentración de ADN. Repita la extracción de ADN con cuidado con soluciones recién preparadas. Recomendamos la extracción de ADN automática con el sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN.
	El ADN contiene inhibidores de la PCR, como proteínas, etanol (de los pasos de precipitación) y el resto de las matrices de productos de la purificación de ADN en fase sólida.	Mida la calidad del ADN. Recomendamos una relación A260/A280 de 1,6-2,0 por espectrofotometría UV. Siga estrictamente el protocolo de extracción de ADN de los distribuidores. Vuelva a extraer el ADN. Recomendamos la extracción de ADN automática con el sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN.
	El ADN se ha extraído de sangre heparinizada.	Utilice sangre no heparinizada o protocolos de extracción de ADN para sangre heparinizada.
	El ADN se disuelve en un tampón que contiene EDTA.	Repita la extracción de ADN y disuelva el ADN en dH <sub>2</sub> O.

**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA *Olerup SSP*<sup>®</sup> sin *Taq* polimerasa**

<b>Problema</b>	<b>Motivo</b>	<b>Acción</b>
<b>Continuación:</b> <b>No hay amplificación (ni amplificación de los fragmentos de control interno ni amplificaciones específicas).</b>	Introducción accidental de lejía en la prueba.	Revise las zonas en las que se haya podido introducir lejía.
	Los kits no se conservan a una temperatura adecuada.	Conserve los kits a -20 °C.
	El termociclador no funciona correctamente.	Calibre el termociclador y compruebe el programa de PCR. Un termociclador utilizado para la tipificación PCR-SSP de rutina debe calibrarse cada 6-12 meses.
	Contacto incorrecto entre el bloque calefactor del termociclador y la placa de tipificación SSP.	Utilice una placa o un retenedor adecuados para pocillos de reacción de paredes finas de 0,2 mL; consulte el manual del termociclador.
<b>Fallo ocasional de la amplificación (caídas).</b>	Los sellados o tapas de tubos PCR que no estén bien cerrados provocarán la evaporación y, en consecuencia, fallos en la amplificación.	Asegúrese de que los sellados y tapas PCR están bien cerrados. Puede aplicarse la almohadilla de compresión <i>Olerup SSP</i> <sup>®</sup> (n.º de producto 103.505-06) encima de los sellados adhesivos de PCR para evitar la evaporación durante el termociclado.
	Errores de carga de gel.	Compruebe que se ha cargado la cantidad de pocillos correcta y que cada pocillo contiene aproximadamente el mismo volumen de mezcla PCR.
	Uso de pipetas no calibradas.	Calibre todas las pipetas de forma habitual de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.
	Errores de pipeteado.	Realice el pipeteado con más cuidado.

**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA Olerup SSP® sin Taq polimerasa**

<b>Problema</b>	<b>Motivo</b>	<b>Acción</b>
<b>Continuación:</b> <b>Fallo ocasional de la amplificación (caídas).</b>	La mezcla maestra y la muestra de ADN no se han mezclado bien antes del uso.	Mézclelas brevemente en vórtice antes de su uso. Recomendamos agitar en vórtice después de cada fila.
	Se ha añadido un volumen desigual de mezcla maestra y ADN en los pocillos.	Realice el pipeteado con más cuidado.
<b>Fragmentos de control interno débiles.</b>	ADN impuro.	Mida la calidad del ADN. La relación A260/A280 debe ser de 1,6-2,0 por espectrofotometría UV. La contaminación del ARN puede provocar una sobrestimación espectrofotométrica de la concentración de ADN. El ADN degradado hace surgir manchas en los carriles de gel. Repita la extracción de ADN con cuidado con soluciones recién preparadas. Recomendamos la extracción de ADN automática con el sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN.
	Poca cantidad de ADN.	Mida la concentración de ADN y ajústela a 30 ng/μL o 15 ng/μL para ADN extraído por el sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN. La contaminación del ARN puede provocar una sobrestimación espectrofotométrica de la concentración de ADN. El ADN degradado hace surgir manchas en los carriles de gel. Repita la extracción de ADN con cuidado con

**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA Olerup SSP® sin Taq polimerasa**

<b>Problema</b>	<b>Motivo</b>	<b>Acción</b>
<b>Continuación:</b> <b>Fragmentos de control interno débiles.</b>		soluciones recién preparadas. Recomendamos la extracción de ADN automática con el sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN.
	Temperatura de hibridación demasiado alta; el termociclador no está calibrado.	Calibre el termociclador y compruebe el programa de PCR. Un termociclador utilizado para la tipificación PCR-SSP de rutina debe calibrarse cada 6-12 meses.
	La mezcla maestra de PCR se ha conservado a +4 °C durante más de 2 semanas.	Conserve correctamente la mezcla maestra de PCR.
<b>Amplificación no específica (escaleras o manchas).</b>	Uso de una muestra de ADN excesiva.	Mida la concentración de ADN y ajústela a 30 ng/μL o 15 ng/μL para ADN extraído por el sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN. Algunas soluciones de cebadores tienen una mayor tendencia a generar amplificación no específica; vea las notas al pie de cada tabla de especificidad específica del lote.
	ADN impuro.	En la interpretación de los resultados obtenidos, deben descartarse todos los fragmentos mayores que el fragmento de control interno. Compruebe la calidad del ADN. Repita la extracción de ADN. Recomendamos la extracción de ADN automática con el

<b>Problema</b>	<b>Motivo</b>	<b>Acción</b>
<b>Continuación:</b> <b>Amplificación no específica (escaleras o manchas).</b>		sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN. Algunas soluciones de cebadores tienen una mayor tendencia a generar amplificación no específica; vea las notas al pie de cada tabla de especificidad específica del lote.
<b>Señales de amplificación cada vez más débiles al cabo del tiempo.</b>	La solución de tinción de gel de agarosa con bromuro de etidio es vieja.	Prepare una nueva solución de bromuro de etidio para conseguir una mejor tinción del gel de agarosa y una mejor señal. Las nubes de los cebadores son fáciles de detectar si la tinción del gel de agarosa es normal.
	Una de las lámparas UV está rota.	Compruebe el equipo de iluminación UV. Las nubes de los cebadores son fáciles de detectar si la iluminación UV es normal.
	Se ha utilizado una muestra de ADN demasiado pequeña.	Mida la concentración de ADN y ajústela a 30 ng/μL o 15 ng/μL para ADN extraído por el sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN.
	Temperatura de hibridación demasiado alta; el termociclador no está calibrado.	Calibre el termociclador y compruebe el programa de PCR. Un termociclador utilizado para la tipificación PCR-SSP de rutina debe calibrarse cada 6-12 meses.
<b>Patrones de amplificación extraños.</b>	Se utiliza una tabla u hoja de trabajo de interpretación específica del lote incorrecta.	Compruebe el número de lote del producto utilizado y la hoja de trabajo o tabla de interpretación utilizada.



**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA Olerup SSP® sin Taq polimerasa**

<b>Problema</b>	<b>Motivo</b>	<b>Acción</b>
<b>Continuación:</b> <b>Patrones de amplificación extraños.</b>	Orden incorrecto en la carga de gel.	Compruebe la alineación de mezclas y carriles de gel.
	El patrón de amplificación contiene un falso positivo.	Véase a continuación.
	El patrón de amplificación contiene un falso negativo.	Véase a continuación.
<b>Amplificaciones de falsos positivos.</b>	Contaminación del ADN.	Utilice guantes, puntas de pipeta con barreras (tapones de filtro) y espacios separados para la manipulación previa a la PCR y la posterior a la PCR. Asegúrese de manipular con cuidado todas las muestras en cada paso. Compruebe la presencia de contaminación con un kit de contaminación Olerup SSP® (Wipe Test kit).
	ADN impuro.	Mida la calidad del ADN. Siga estrictamente el protocolo de extracción de ADN de los distribuidores. Pruebe otros sistemas de extracción de ADN. Vuelva a extraer el ADN. Recomendamos la extracción de ADN automática con el sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN.
	Uso de una muestra de ADN excesiva.	Mida la concentración de ADN y ajústela a 30 ng/μL o 15 ng/μL para ADN extraído por el sistema EZ1 DSP DNA Blood de QIAGEN.
	Temperatura de hibridación muy baja.	Calibre el termociclador y compruebe el programa de PCR. Un termociclador utilizado para la tipificación PCR-

**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA Olerup SSP® sin Taq polimerasa**

<b>Problema</b>	<b>Motivo</b>	<b>Acción</b>
<b>Continuación:</b> <b>Amplificaciones de falsos positivos.</b>		SSP de rutina debe calibrarse cada 6-12 meses.
	Demasiado tiempo transcurrido entre la instalación de PCR y el inicio del termociclado.	No debe permitirse un retraso superior a 5 minutos antes del termociclado.
	Mucho tiempo transcurrido entre la colocación de las placas de tipificación en el termociclador y el inicio del termociclado.	Utilice un termociclador precalentado.
	Uso de bromuro de etidio excesivo.	Utilice la cantidad recomendada de bromuro de etidio.
	Interpretación incorrecta de un artefacto como una banda específica.	Compruebe la tabla u hoja de trabajo de interpretación específica del lote y la tabla de especificidad para el tamaño de banda correcto y las notas al pie.
	El patrón de amplificación contiene un falso positivo.	Compruebe si todas las amplificaciones específicas tienen el tamaño adecuado o si se ha malinterpretado como amplificación un artefacto (arrastre de muestra, dímero del cebador).
	Orden incorrecto en la carga de gel.	Compruebe la alineación de mezclas y carriles de gel.
<b>Amplificaciones de falsos negativos.</b>	El termociclador no está bien calibrado.	Calibre el termociclador y compruebe el programa de PCR. Un termociclador utilizado para la tipificación PCR-SSP de rutina debe calibrarse cada 6-12 meses. Si no se corrige con la recalibración, vuelva a

**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA Olerup SSP® sin Taq polimerasa**

<b>Problema</b>	<b>Motivo</b>	<b>Acción</b>
<b>Continuación:</b> <b>Amplificaciones de falsos negativos.</b>		tipificar la prueba con una muestra de referencia de la misma especificidad. Si se confirma la negatividad, póngase en contacto con el departamento de atención al cliente.
	Orden incorrecto en la carga de gel.	Compruebe la alineación de mezclas y carriles de gel.
<b>Problemas generales con el gel (geles borrosos y/o carriles manchados).</b>	Muestra de ADN degradado.	Aparece una mancha en los carriles de gel. Aíse el ADN de una muestra reciente.
	Muchas estrías en algunos pocillos.	Suspensiones irregulares de ADN. Asegúrese de que la muestra de ADN esté disuelta antes de tomar una alícuota. Agite en vórtice la muestra de ADN diluido.
	El producto de PCR ha rebasado los bordes del pocillo.	Alinee cuidadosamente las puntas de pipeta con los pocillos de gel y dispense lentamente.
	Es posible que el tampón de electroforesis esté demasiado caliente.	Prepare un nuevo tampón de TBE. Hágalo circular a un voltaje más bajo.
	Se ha utilizado un porcentaje incorrecto de gel de agarosa.	Asegúrese de que utiliza el gel de agarosa al 2% recomendado.
	La agarosa no se ha disuelto totalmente.	Vuelva a hervirla brevemente para que se funda la agarosa.
	Concentración de TBE incorrecta.	Utilice la concentración de 0,5 x TBE recomendada.
	Geles colados hace poco.	Los geles no están listos para usarse hasta pasados 15 minutos desde el colado.
	Geles demasiado antiguos.	No cuele los geles demasiado pronto.

**Instrucciones de uso**  
**Kits de tipificación de HLA *Olerup SSP*® sin *Taq* polimerasa**

<b>Problema</b>	<b>Motivo</b>	<b>Acción</b>
<b>Continuación:</b> <b>Problemas generales con el gel (geles borrosos y/o carriles manchados).</b>	El peine de gel utilizado tiene ranuras demasiado gruesas.	Utilice peines finos (4 x 1 mm).
	La placa de gel no es transparente a UV.	Extraiga el gel de la placa antes de visualizarlo.
	Fotografía de gel demasiado brillante.	Uso de bromuro de etidio excesivo. Compruebe la configuración de la cámara.
	Fotografía de gel demasiado oscura.	Utilice la cantidad recomendada de bromuro de etidio. Compruebe la configuración de la cámara.
<b>Problemas generales con la amplificación de falsos negativos o problemas dependientes test-a-test de naturaleza similar.</b>	Tasa de incremento de temperatura demasiado alta.	Los kits de <i>Olerup SSP</i> se validan con el termociclador GeneAmp 9700 en modo 9600 y ProFlex con una tasa de incremento de temperatura de 3 °C/s. Elevadas tasas de incremento de temperatura, mayores que las descritas, pueden tener efectos en los resultados de la tipificación.

## MARCAS COMERCIALES UTILIZADAS EN ESTE DOCUMENTO/PRODUCTO

*Olerup SSP*<sup>®</sup> es una marca comercial registrada de *CareDx AB*.

Qiagen<sup>™</sup> es una marca comercial de QIAGEN.

**AVISO AL COMPRADOR:** Kits *Olerup SSP*<sup>®</sup> sin *Taq* polimerasa – Se recomienda utilizar este producto con *Taq* polimerasa, grado GMP, de Roche (n.º de catálogo: 03 734 927 001 o 03 734 935 001) en el proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que goza de patentes de Roche Molecular Systems, Inc. y F. Hoffmann-La Roche Ltd. ("Roche"). El laboratorio es responsable de contactar con Roche Molecular Systems, Inc. para determinar si se necesita una licencia bajo estas patentes.

## GARANTÍA

*CareDx AB* garantiza al comprador original que sus productos no presentan defectos de material o de mano de obra si se utilizan y aplican de forma normal. La única obligación de *CareDx AB* de acuerdo con esta garantía será cambiar, sin ningún coste, cualquier producto que no cumpla los niveles de funcionamiento indicados en la hoja de especificación del producto.

Esta garantía es válida únicamente para productos que se hayan manipulado y almacenado de acuerdo con las recomendaciones de *CareDx AB* y no sirve para productos que hayan sido objeto de alteración, abuso o uso indebido.

Todas las reclamaciones amparadas por esta garantía deben dirigirse a *CareDx AB* por escrito y deben ir acompañadas de una copia de la factura del comprador. Esta garantía reemplaza cualquier otra garantía, expresa o implícita, incluidas las garantías de comerciabilidad e idoneidad para un fin concreto. En ningún caso se responsabilizará a *CareDx AB* de daños accidentales o consecuentes.

Este producto no puede reformularse, reenvasarse o revenderse de ningún modo sin el consentimiento por escrito de *CareDx AB*, Franzéngatan 5, SE-112 51 Estocolmo, Suecia.

Manipule todas las muestras como posibles transmisoras de enfermedades. Todas las tareas deben llevarse a cabo con guantes y la protección adecuada.

## CERTIFICADO DE GARANTÍA

*CareDx AB* garantiza que los cebadores de las placas de tipificación *Olerup SSP*<sup>®</sup> tienen las especificidades indicadas en la hoja de trabajo y las tablas de interpretación y especificidad específica del lote del prospecto del producto.

**DIRECCIONES:**

**Fabricante:**

**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Estocolmo, Suecia

**Tel.:** +46-8-508 939 00

**Fax:** +46-8-717 88 18

**Correo electrónico:** orders-se@caredx.com

**Página web:** www.caredx.com

**Distribuido por:**

**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Estocolmo, Suecia

**Tel.:** +46-8-508 939 00

**Fax:** +46-8-717 88 18

**Correo electrónico:** orders-se@caredx.com

**Página web:** www.caredx.com

**CareDx Lab Solutions Inc.**, 901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382

**Tel.:** 1-877-653-7871

**Fax:** 610-344-7989

**Correo electrónico:** orders-us@caredx.com

**Página web:** www.caredx.com

**CareDx Pty Ltd.**, 20 Collie Street, Fremantle WA 6160, Australia.

**Tel.:** +61 8 9336 4212

**Correo electrónico:** orders-aus@caredx.com

**Página web:** www.caredx.com

**Representante autorizado:**

**Qarad Suisse S.A.**, World Trade Center, Avenue Gratta-Paille 2, 1018 Lausanne, Suiza.

CHRN: CHRN-AR-20002058

Para obtener más información sobre los distribuidores de CareDx en todo el mundo, póngase en contacto con CareDx AB.

0415-LBL v05 es la traducción del texto maestro en inglés 0193-LBL v07 *Olerup SSP*<sup>®</sup> HLA, kits de tipificación sin *Taq* polimerasa.

Cambios en la revisión 0193-LBL v07 en comparación con 0193-LBL v06:

1. Adición de un representante autorizado suizo.
2. Adición de GelRed a la Sección B. Materiales necesarios, pero no provistos.