

Instrucciones de uso

Kits Protrans SSP

PROTRANS Cyclerplate System

Tipaje de DNA por biología molecular, técnica SSP

Cyclerplate System

REF	SSP	CE
-----	-----	----

200 070	HLA- A	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">IVD</div> CE 0197
200 080	HLA- B	
200 030	HLA- DRB1	
200 020	HLA- A,- B,- DRB1	
200 010	HLA- A,- B,- C	
200 011	HLA- A,- B	
200 050	HLA- DRB1- DQB1	
200 090	HLA- C	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">IVD</div> CE
200 040	HLA- DQB1 low	
200 048	HLA- DQB1 high	
200 049	HLA- DQA1 high	
200 096	Cytokine 2	
200 100	Cyclercheck 10	CE
200 105	Cyclercheck 5	



Usos para diagnóstico in vitro



Conservar los Buffer D, R, E e Y a - 20°C y las placas de 4°C a 8°C



Ver etiqueta en el kit



Protrans Medizinische Diagnostische Produkte GmbH

D- 68775 Ketsch Hohwiesenweg 51

Tel.: 0049-(0)6202-692966 Fax: 0049-(0)6202-692967

www.mediprotrans.de - mail@mediprotrans.de

Contenido:

		Página
	Contenido	2
	Licencia PCR	3
	Símbolos	3
1.	Introducción	3
1.1	Uso	3
1.2	Resumen	3
1.3	Principio del test	3
2.	Reactivos	4
2.1	Contenido de los kits Protrans SSP	4
2.2	Peligros y precauciones	4
2.3	Almacenamiento y caducidad	4
3.	Apartos necesarios	5
3.1	Programa del termociclador	5
4.	Toma de muestras y preparación	5
4.1	Aislamiento del DNA	5
4.2	Muestras no aceptables	5
5.	Materiales	6
5.1	Material suministrado	6
5.2	Material adicional, reactivos y equipamiento requerido pero no suministrado	6
6.	PCR	7
6.1	Medidas de precaución	7
6.2	Área Pre-PCR	7
6.3	Área Post-PCR	7
7.	Instrucciones para los kits Protrans PCR-SSP Cyclerplate	7
7.1	Preparación de la PCR	7
7.2	Preparación del Master Mix para PROTRANS Cyclerplate System	7
7.3	Dispensado del Master Mix en las placas PROTRANS	7
7.4	Cierre de las placas PROTRANS	7
7.5	Tabla: PROTRANS Cyclerplate System y Buffers PROTRANS	8
7.6	Tabla: Volumen de Buffers PROTRANS y Taq Polymerase para el Mastermix	8
7.7	Tabla: Número y posiciones de los Mixes	8
8.	Post PCR	9
8.1	Electroforesis: Introducción	9
8.2	Electroforesis en gel: Realización	9
8.3.	Interpretación de resultados y documentación	9
8.4	Interpretación de resultados	9
8.5.	Interpretación del gel	10
9	Limitaciones del procedimiento	11
10	Control de calidad	11
11	Problemas frecuentes	12
12	Bibliografía	14



Kit Protrans SSP con Taq Polymerasa-Licencia limitada:

El precio de compra de este producto incluye los derechos limitados y no transferibles de las patentes U.S. 4,683,202, 4,683,195 y 4,965,188 y sus homólogas extranjeras, propiedad de Roche Molecular Systems, Inc. y F. Hoffmann- La Roche Ltd. ("Roche"), para usar sólo esta cantidad de producto para utilizar la reacción de PCR descrita en dichas patentes únicamente para aplicaciones en el tipaje HLA del comprador únicamente para el trasplante de órganos, tejidos o médula ósea, y explícitamente excluye al análisis forense y las pruebas de paternidad. El derecho para utilizar este producto para ofrecer un servicio comercial para el tipaje HLA para el trasplante de órganos y tejidos usando PCR incluyendo, como resultado de las actividades del comprador, un honorario o consideración comercial, está por la presente garantizado. Se puede obtener más información sobre las licencias de compra contactando en los Estado Unidos con el director de licencias de Roche Molecular Systems, Inc. (1145 Atlantic Avenue, Alameda, California94501) o en Suiza con el PCR Licensing Manager , F. Hoffmann-La Roche Ltd., Grenzacherstr.124, CH – 4070 – Basilea (Suiza).

Kit Protrans SSP sin Taq Polymerasa-Licencia limitada:

Este producto esta optimizado para el uso de la PCR que esta cubierto por las patentes propiedad de Roche Molecular Systems, Inc. y F. Hoffmann- La Roche Ltd. ("Roche"). La licencia no va a ser proporcionada por la compra de estos productos. Se puede obtener más información sobre las licencias de compra contactando en los Estado Unidos con el director de licencias de Roche Molecular Systems, Inc. (1145 Atlantic Avenue, Alameda, California94501) o en Suiza con el PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Grenzacherstr.124, CH – 4070 – Basilea (Suiza).

Símbolos:

REF	NC	IVD		
Número de artículo	Control negativo	Para diagnóstico in vitro	Almacenamiento	Caducidad

1. Introducción.

1.1 Uso

Los kits Protrans SSP (Sequence specific primers) son utilizados para la determinación de los alelos de HLA clase I o HLA clase II basándose en la técnica PCR-SSP.

1.2 Explicación y resumen

El sistema HLA es un sistema de antígenos complejo y con herencia co-dominante que juegan un papel importante en el sistema inmune ya que permiten distinguir "lo propio" de "lo extraño". En el trasplante de órganos , la compatibilidad HLA entre el donante y el receptor es uno de los factores más importantes para el éxito del trasplante . Por esta razón, la determinación de las combinaciones individuales de antígenos HLA es usada para seleccionar al donante adecuado para un receptor concreto.

Han salido a la luz nuevas técnicas para la determinación de los antígenos HLA basadas en biología molecular ya que los antígenos HLA difieren unos de otros en una pequeña cantidad de aminoácidos dentro de una cadena polipeptídica. El reconocimiento de estas estructuras similares es a veces muy complicado por técnicas serológicas. Por esta razón, la capacidad de resolución de estas técnicas es limitada.

Como conocemos las secuencias DNA de los alelos más importantes, las diferencias entre dichos alelos se pueden localizar a nivel de DNA con la ayuda de oligonucleótidos sintéticos. Utilizando amplificaciones del DNA genómico (PCR) junto con hibridaciones específicas (SSP) es posible identificar un gran número de alelos HLA por métodos de biología molecular.

1.3 Principio de test

Los kits Protrans utilizan técnicas de PCR para la determinación de alelos HLA y HPA o para la determinación de polimorfismos de citoquinas. Los métodos SSP utilizan para el tipaje primers alelo-específicos en la reacción de amplificación.

El principio se basa en que sólo los primers cuyas secuencias son perfectamente complementarias a las de la muestra de DNA hibridarán y producirán un fragmento de amplificación. Los primers no complementarios no se unirán al DNA y no generarán productos de amplificación.

El DNA amplificado se determina mediante una electroforesis en gel de agarosa. La correcta amplificación generará fragmento de DNA de un tamaño conocido que aparecerán como una banda en el gel. Si no existe amplificación, no vemos ninguna banda.

La composición de los Primer Mix en cada pocillo de los kits Domino y Cycloplate permite la identificación de los diferentes alelos específicos de cada locus HLA, Alelo HPA o polimorfismo de citoquinas.

Los kits Protrans SSP son test para el diagnóstico in vitro del sistema inmune de donantes de órganos y de receptores y de pacientes que reciben una terapia de sustitución de componentes sanguíneos.

2. Reactivos

2.1. Contenido de los kits Protrans

El contenido de los kits Protrans SSP es suficiente para el tipaje de 5, 10, 20, 40 o 60 muestras. Cada kit contiene dos componentes distintos:

1. Placas de PCR (Cyclerplates) con pocillos de 0.2 ml.

Los kits Protrans Cycloplate de 96 pocillos contienen mixes de primers específicos prepipeteados y secados (liofilizados) en cada uno de los pocillos. Las especificidades en cada uno de los pocillos vienen indicadas en las tablas de interpretación de cada uno de los lotes enviadas junto con los kits.

Remitirse a la tabla 7.7 para el número de Primer Mixes de cada kit de cada kit Protrans Cycloplate.

Las placas de 96 pocillos están selladas en bolsas de plástico. Cada bolsa contiene 10 Placas Cycloplate. La placa situada en la parte superior lleva una etiqueta que indica el nombre del producto y el lote específico de los reactivos usados. Además, cada placa está marcada en el límite derecho con el lote del producto. Cada pocillo está marcado con una combinación número-letra del A1 al H12. Los dígitos son visibles en la parte superior de la placa mientras que las letras se localizan en el lateral izquierdo de la placa. La posición inicial es la H1. Para una mejor orientación la parte inferior está marcado con una línea negra.


Las tiras para cerrar las placas vienen con los kits en bolsas de 12.

2. Buffers



Los buffers son específicos para kit. Dependiendo del kit se usa el buffer D, R o E junto con el Buffer Y. Ver tabla 7.5 y 7.6.

Para evitar procesos de descongelación y congelación de los MasterMix (Protrans Buffer D and Buffer R) recomendamos alicuotar el Mastermix en viales de 276 ul. ya que este es el volumen necesario para completar una placa de 96 pocillos.

2.2. Peligros y precauciones

	El test debe ser ejecutado por técnicos de laboratorio autorizados y bien entrenados
	Todos los reactivos deben ser manipulados de acuerdo a buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones apropiadas.
	Hay que tener en cuenta que las muestras humanas son potencialmente infecciosas. No pipetear con la boca.
	Todas las placas usadas deberían ser consideradas como potencialmente infecciosas y deberían ser destruidas de acuerdo a unas directrices válidas a nivel nacional.
	No use reactivos caducados (Ver fecha de caducidad indicada en el mismo)
	Los espacios donde se ejecutan la Pre-PCR y la Post-PCR deben estar separados.
	Las pipetas usadas para la POST-PCR no deberían ser usadas para la Pre-PCR.
	El bromuro de etidio utilizado para teñir el DNA es un cancerígeno potencial. Su manipulación requiere la utilización de guantes protectores. Cuando manipules los geles teñidos, sigue las directrices nacionales.
	Usa protección de los ojos para evitar la exposición a los rayos UV cuando visualicemos el gel.
	Ver la hoja de seguridad de los materiales(MSDS) para obtener información detallada. Información facilitada por Protrans..

2.3. Almacenamiento y viabilidad

Partes del Kit			Componentes del kit		
Placas de 96 pocillos (polipropileno)			Primers (PCR)- rojo cresol (Oligonucleótidos DNA)	4-8°C	Ver etiqueta
Buffer	D	R	Sulfato de amonio, Tris-Buffer, MgCl ₂ , Glicerol, Rojo Cresol, dNTPs (deoxirribonucleótidos)	-20°C ¹⁾	Ver etiqueta
Buffer	Y		Solución acuosa	-20°C	Ver etiqueta
Buffer	E		Ácido dideoxirribonucleico	-20°C	Ver etiqueta

- 1) Los viales descongelados pueden ser almacenados de 2 a 8 °C durante al menos un mes manteniendo todos sus cualidades.

Una vez que los kits han sido abiertos, los que están aún sin utilizar se guardan cerradas en el envase original sellando con el cierre hermético para evitar la acumulación de humedad.

3. Requisitos instrumentales

3.1. Programar el termociclador.

Para la obtención de resultados óptimos es muy importante obtener rápidas variaciones de tiempo (1°C/s) y un control preciso de la temperatura. El siguiente perfil del termociclador está optimizado y validado con los termocicladores indicados 5.2.3. para el uso con PROTRANS SSP Cycloplate System y Domino System.

El volumen final de la mezcla de amplificación es 10 µl.

Desnaturalización inicial	94°C	2 min	Mantener
Desnaturalización	94°C	10 seg	10 ciclos
Hibridación y extensión	65°C	60 seg	
Desnaturalización	94°C	10 seg	20 ciclos
Hibridación	61°C	50 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Conservación	4°C	∞	Mantener

4. Toma de muestras y preparación

4.1. Aislamiento del DNA.

El DNA genómico puede ser obtenido de cualquier célula nucleada. Los materiales de partida son sangre en citrato o en EDTA o suspensiones celulares. Una gran variedad de protocolos han sido formulados para el aislamiento del DNA. Para los test PCR-SSP sólo aquellos métodos que proporcionan un DNA de elevada calidad y cantidad serán tenidos en cuenta.

El kit de extracción de PROTRANS DNA Box 500/5000 proporciona un DNA de gran estabilidad y calidad. Cualquier método de extracción debe ser validado antes de ser usado en un laboratorio de forma rutinaria.

La concentración del DNA debe estar ajustada al final a una concentración de **50 – 100 ng/µl**.

La **ratio** (pureza) A260/A280 debería ser **1.6 – 1.8**.

La concentración y la pureza del DNA son puntos críticos para la obtención de resultados óptimos.

Las muestras de DNA deben ser usadas inmediatamente o conservadas a -20°C si no lo vamos a testar (Hasta un año) sin presenciar efectos adversos en los resultados

Para obtener información acerca del almacenaje y estabilidad del DNA aislado, póngase en contacto con el fabricante del kit de aislamiento en cuestión.

Usar muestras de sangre con EDTA o Citrato.

No usar muestras con Heparina ya que esta sustancia inhibe la PCR.

4.2. Muestras no aceptables

La contaminación del DNA por inhibidores como la hemoglobina, heparina, etanol... puede suponer una seria interferencia para la reacción de la PCR.

Por esta razón, **la sangre obtenida en tubos de heparina** no es adecuada como material de partida para el aislamiento del DNA.

Si el paciente está en tratamiento de heparina, utilizar otra fuente de DNA como material de partida.

Evitar el uso de muestras lipémicas o hemolizadas.

El uso de muestras obtenidas sin anticoagulante o congeladas/descongeladas múltiples veces no está recomendado ya que estas condiciones quizá no proporcionen la suficiente cantidad o calidad para testar el DNA.

5. Materiales

5.1 Materiales suministrados

Ver apartado 2.1: contenido de los kits PROTRANS SSP.

5.2 Materiales adicionales, reactivos y equipamiento necesario pero no suministrado.

Todos los reactivos y equipamientos diferentes deberán ser validados por el usuario.

5.2.1. Espectrofotómetro UV para la medida del DNA

ejemplo: Lambda Scan 200, MWG, www.THE.MWG.com

Programa del fotómetro: KC 4, Bio-Tek Instruments, Inc. www.biotek.com

El uso de otro espectrofotómetro requiere la validación por parte del usuario.

5.2.2. DNA Taq Polimerasa

Las siguientes enzimas están validadas para el uso con los kits PROTRANS SSP:

- AmpliTaq, Perkin Elmer, 5U/μl, Cat.No. N8010060
- MBI Fermentas DNA Taq Polymerase, 5U/μl, Cat.No. EP0402

El uso de otra enzima requiere la validación por parte del usuario.

5.2.3. Termociclador

Los siguientes termocicladores de 96 pocillos y tapa térmica están validados para el uso con los kits PROTRANS SSP:

- PE 2700, Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com
- (la producción de PE 9600 ha finalizado)
- PTC-100, PTC-200 MJ Research, Inc., www.mjr.com

El uso de otro termociclador requiere la validación por parte del usuario.

Los termocicladores que no tienen una tapa ajustable a presión requieren un adaptador para garantizar la correcta transmisión del calor desde la tapa a todos sus tubos PCR

5.2.4. Pipetas

- Pipetas ajustables para volúmenes:
 - 1-10μl
 - 10-100μl
 - 100-1000μl
- Multipipeta Eppendorf tipo 4720
- Pipeta multicanal (Finnpipette, ThermoLabsystems Cat.No. 4510020)

5.2.5. Material desechable

- Puntas adecuadas para cada una de la pipetas
- Tubos de reacción de polipropileno de 1,5 ml (Eppendorf Safe-Lock, Cat.No. 0030 120.86)
- Puntas de 0.5 ml para la Multipipeta Eppendorf tipo 4720

5.2.6. Gel - Electroforesis

Agarosa (para biología molecular)

TAE (1x) – Buffer de electroforesis.

- TAE = Tris-Buffer /Ácido acético concentrado (CH₃COOH) / 0,5 M Na₂-EDTA pH 8.0

Agua destilada (dH₂O)

Disolución de bromuro de Etidio (10mg/ml); **Precaución:** El Bromuro de Etidio es un mutágeno potencial (ver 2.2.)

- Agitador magnético con placa térmica o un microondas
- Marcador de peso molecular (50 – 1000 bp)
- Cámara de electroforesis y peines (PROTRANS REF 210 000, 210 001)
- Sistema para documentar la información del gel
 - Cámara Polaroid con filtro UV y película Polaroid tipo 667
 - Visor de luz UV (312 nm)

6. PCR

6.1 Medidas de precaución

El método PCR es tan sensible que puede amplificar de forma muy eficiente pequeñas cantidades de DNA, hasta el punto de amplificar DNA contaminante a nivel de trazas falsificando así los resultados de la muestra

Una fuente importante de contaminación es el DNA amplificado que entra en contacto con DNA que todavía no ha sido amplificado.

Para evitar este tipo de contaminación se recomienda que las dos áreas de trabajo estén separadas como se indica a continuación:

- **Área Pre – PCR:**
 Todos los pasos llevados a cabo antes de la PCR (aislamiento y almacenamiento de DNA, preparación de la PCR, producción y almacenamiento de reactivos y soluciones para la extracción del DNA y PCR).
 Cuando trabajamos en el área pre-PCR, las puntas de las pipetas deben llevar filtro.
 Se recomienda usar un control negativo para detectar posibles contaminaciones.
- **Área Post – PCR:**
 En esta área se encuentran el termociclador, el gel de electroforesis y el almacenamiento del DNA amplificado.
 El equipamiento y los materiales desechables del área post-PCR no deben ser cogidos del área pre-PCR.

7. Instrucciones para los kits PROTRANS SSP

7.1 Preparación de la PCR

7.1.1.	Sacar de la nevera las placas necesarias.
7.1.2	Sacar del congelador la Taq Polimerasa y los Buffers PROTRANS correspondientes.
7.1.3.	Colocar la Taq Polimerasa y la placa en la estación de trabajo PROTRANS previamente preenfriada (-20 °C) o en un soporte de placas de 96 pocillos
7.1.4	Si procede, dividir la placa en test individuales con un Cutter o tijeras.
7.1.5.	Descongelar los Buffers D o R o E y Buffer Y.

7.2 Preparación del Master Mix

7.2.1	Para cada muestra a testar, pipetear el volumen apropiado de Buffer D o R o E y Buffer Y y de Taq Polimerasa en un tubo de 1.5 ml. Ver tabla 7.6
7.2.2	Vortear el Mastermix
7.2.3	Cuando introducimos un control negativo, pipetear 10 ul. del Mastermix sin DNA en el pocillo adecuado. Ver tabla 7.6 y 7.7.
7.2.4	Añadir a cada Mastermix el volumen adecuado de DNA para el test. Ver tabla 7.6
7.2.5	Vortear el Mastermix

7.3 Dispensado del Master Mix

7.3.1	Dispensar 10 µl del Mastermix en cada pocillo de la placa pero no en el control negativo. No se debe tocar el fondo del pocillo con la punta de la pipeta, así pues, pipetear en la parte superior de cada pocillo y la gota caerá al fondo.
-------	--

7.4 Sellado de las placas

7.4.1.	Asegurarse de que Mastermix está en el fondo de los pocillos mediante un control visual. En caso contrario, centrifugar o dar suaves golpes a la placa.
7.4.2.	Sellar las placas cuidadosamente usando las tiras proporcionadas por PROTRANS. Asegurarse de que las tapas están perfectamente selladas para evitar la evaporación dentro del termociclador.
7.4.3	Colocar las placas en el termociclador y comenzar la PCR. El volumen final en cada pocillo debe ser de 10 µl. Si no podemos comenzar la amplificación inmediatamente, conservar la placa de 2 a 8 °C .

7.5	Buffers PROTRANS			
Ref	SSP	Buffer	Buffer	
200 070	HLA- A	D	Y	
200 080	HLA- B	D	Y	
200 090	HLA- C	D	Y	
200 030	HLA- DRB1	R	Y	
200 040	HLA- DQB1 low	R	Y	
200 020	HLA- A,- B,- DRB1	D	Y	
200 010	HLA- A,- B,- C	D	Y	
200 011	HLA- A,- B	D	Y	
200 050	HLA- DRB1- DQB1	R	Y	
200 048	HLA- DQB1 high	R	Y	
200 049	HLA- DQA1 high	R	Y	
200 096	Cytokine 2	R	Y	
200 100	Cyclercheck 10	D	E	Y
100 105	Cyclercheck 5	D	E	Y

7.6	Volúmenes de Buffers y Taq Polimerasa para el Master Mix							
Ref	Protrans SSP Cyclerplate System	Buffer/µl		Buffer/µl		Taq Pol	Control negativo	DNA 50-100 ng/µl
200 070	HLA- A	D	70	Y	140	1,6 µl	-	50 µl
200 080	HLA- B	D	140	Y	280	3,3 µl	-	100 µl
200 090	HLA- C	D	70	Y	140	1,6 µl	A 3,6,9,12	50 µl
200 030	HLA- DRB1	R	70	Y	140	1,6 µl	A 3,6,9,12	50 µl
200 040	HLA- DQB1 low	R	46	Y	94	1,1 µl	C 2,4,6,8,10,12	34 µl
200 020	HLA- A,- B,- DRB1	D	280	Y	560	6,5 µl	A 12	200 µl
200 010	HLA- A,- B,- C	D	280	Y	560	6,5 µl	A 12	200 µl
200 011	HLA- A,- B	D	210	Y	420	5,0 µl	H 10	150 µl
200 050	HLA- DRB1- DQB1	R	115	Y	230	2,8 µl	A 3,9 C 5,11	85 µl
200 048	HLA- DQB1 high	R	140	Y	280	3,3 µl	D 6,12	100 µl
200 049	HLA- DQA1 high	R	70	Y	140	1,6 µl	D 3,6,9,12	50 µl
200 096	Cytokine 2	R	140	Y	280	3,3 µl	-	100µl
200 100	Cyclercheck 10	R	276	Y	710	6,5µl	Buffer E	50µl

100 105	Cyclercheck 5	R	276	Y	710	6,5µl	Buffer E	50µl	
7.7	Números y posiciones de los Primer Mixes de PROTRANS Cyclerplate System								
REF	Protrans Cyclerplate System	Número de Mixes	Posición del Primer Mix				Posición del Control Negativo		
200 070	HLA- A	4x 24	1H, 4H, 7H, 10H				-		
200 080	HLA- B	2x 48	1H, 7H				-		
200 090	HLA- C	4x 24	1H, 4H, 7H, 10H				3A,6A,9A,12A		
200 030	HLA- DRB1	4x 24	1H, 4H, 7H, 10H				3A,6A,9A,12A		
200 040	HLA- DQB1 low	6x 14	1H, 3H, 5H, 7H, 9H, 11H				2C,4C,6C,8C,10C,12C		
200 020	HLA- A,- B,- DRB1	96	A*: 1H; B*: 4H; DRB1*: 10H				12A		
200 010	HLA- A,- B,- C	96	A*: 1H; B*: 4H; Cw*: 10H				12A		
200 011	HLA- A,- B	73	A*: 1H; B*: 4H				10H		
200 050	HLA- DRB1- DQB1	2x 38	DRB1* 1H, 7H; DQB1* 4H, 10H				3A,5C,9A,11C		
200 048	HLA- DQB1 high	2x 45	1H, 7H				6D,12D		
200 049	HLA- DQA1 high	4x 21	1H, 4H, 7H, 10H				3D,6D,9D,12D		
200 096	Cytokine 2	2x 48	1H, 7H				-		
200 100	Cyclercheck 10	96	1H				-		
100 105	Cyclercheck 5	96	1H				-		

8. Post-PCR

Después de ejecutar la PCR, se retira la placa del termociclador y se procede con la electroforesis en gel. Si no preparamos el gel inmediatamente, conservar la placa a 4 °C para un máximo de 2 días y a -20 °C si el tiempo es mayor.

8.1 Gel de electroforesis

Los productos de la PCR son identificados mediante una electroforesis en gel de agarosa seguido de una detección de bandas de DNA en luz UV.

8.2 Electroforesis en gel: Realización.

En primer lugar se prepara la disolución de agarosa al 2% en TAE 1x mezclando 4 gr. de agarosa en 200 mL de TAE. Se calienta en una placa calefactora con agitador magnético o en un microondas hasta que se disuelva toda la agarosa.

Dejar que la solución se enfríe hasta aproximadamente 60 °C y añadir el Bromuro de Etidio.

Disolución de Bromuro de Etidio (10mg/ml)

Disolver 100mg de Bromuro de Etidio en 10ml de agua destilada. Guardar de 2-8°C protegido de la luz.



Precaución : El Bromuro de Etidio es mutagénico y tóxico. Su manipulación exige el uso de guantes protectores (también en la forma diluida). En caso de contacto con la piel lavar la zona con abundante cantidad de agua.

Colocar las cubetas para la preparación de los geles en superficie horizontal. Rellenar con agarosa evitando la formación de burbujas y colocar los peines (4 peines de 25 ranuras) en el gel. La distancia entre las púas de los peines corresponde a la distancia que hay entre dos puntas de una pipeta multicanal lo que permite cargar las muestras de una forma muy rápida en el gel.

Después de la polimerización (De 30 a 60 minutos a temperatura ambiente) quitar los peines y colocar el gel en la cámara de electroforesis que ha sido previamente rellenada con buffer TAE 1x. El buffer debe sumergir completamente (2 ó 3 mm por encima del gel)

Quitar cuidadosamente las tapas de las placas y pipetear todo el producto PCR con una pipeta multicanal en las ranuras del gel. Asegúrate que el orden en el que se van a cargar las muestras es el correcto.

Como los Primer Mix contiene glicerol y rojo cresol, no es necesario añadir a las muestras un tampón de carga.

Precaución: Movimientos bruscos en las placas pueden dispersar el producto amplificado. Este hecho, además de contaminar el laboratorio, puede provocar la repetición del test.

Para medir el tamaño de las bandas obtenidas puede ser incluido un maracador de peso molecular (50-1000 bp ladder)

Correr la electroforesis durante 20 minutos a 170 V.

Una vez completada la electroforesis, desconectar la cámara de electroforesis de la fuente de alimentación.

8.3 Interpretación de los resultados y documentación

Colocar el gel en el transiluminador UV (Indispensable el uso de protección para la cara contra los rayos UV). Para la interpretación y documentación de los resultados realizar una foto del gel.

8.4 Interpretación de resultados

Cada uno de los Primermix contiene un control de amplificación formados por una parte de 89 pb del gen de la β -globin en el caso de HLA clase I o una parte del gen de la proteína C-reactiva de 440 bp en el caso de HLA class II.

La concentración de estos primers es menor que el de los primers alelo específicos y su propósito es proporcionar un control interno que indicará una correcta amplificación.

La amplificación de estas bandas no alélicas se produce tanto en presencia como en ausencia de fragmentos de PCR alelo específicos, por tanto estas bandas se pueden observar en todas las reacciones de PCR

En presencia de fragmento alelo específicos, la banda control puede ser muy débil e incluso desaparecer. Esto no supone ninguna limitación debido a que el simple hecho de que ha aparecido una banda alelo específica indica que la amplificación ha sido satisfactoria.

La aparición de los positivos e identificación del alelo van a proporcionar el tipaje HLA para esta muestra.

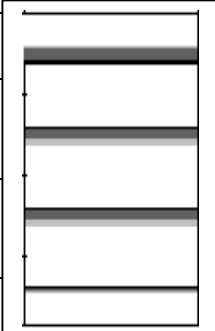
La interpretación se basa en la presencia o no de una banda de amplificación. No hay que tener en cuenta el tamaño de la banda a la hora de evaluar el test, sin embargo, podría ser útil para la interpretación del test.

Para la evaluación del patrón de bandas, PROTRANS adjunta unas hojas de trabajo para que todo el tipaje quede perfectamente documentado. También se adjuntan unas tablas de Primer Mix y de amplificación muy útiles para la interpretación de los resultados.

Además existe el programa Score (www.ihwg.org) que proporciona una interpretación detallada de los resultados.

La presencia de bandas en el control negativo indican la presencia de una contaminación, con lo que los resultados deben ser invalidados y el test repetido.

8.5 Interpretación del gel

PROTRANS HLA clase I	Reacción positiva	PROTRANS HLA clase II
Pocillo del gel		Pocillo del gel
Banda específica >100-900bp		Banda específica >100-900bp
Banda de control 89 bp		Banda de control 89 bp
Primers residuales		Primers residuales

1. Si aparecen bandas débiles de distinto tamaño, ignóralas siempre y cuando la amplificación sea correcta y lo suficientemente clara.

2. Primers residuales darán una banda difusa de aproximadamente 50 pb.
3. Se puede observar la formación de dímeros (< 80 bp) de forma ocasional. Los dímeros no van a invalidar el test ya que para evitar una mala interpretación de los resultados basta con comprobar los tamaños de bandas que debes obtener para cada Mix que vienen indicados en la documentación adjunta al kit.
4. Algunos de los primers de HLA-A (mixes 5, 16, 19 y 24) y de HLA-B (mixes 5, 9, 43 y 47) pueden dar bandas de bajo peso molecular (< 200 bp). Estos productos de PCR podrían ser confundidos con el control interno (89 bp), sin embargo, dan una señal mucho más fuerte que la del control y tampoco migraran tan lejos. Si no está seguro de que la señal más fuerte sea debida a un producto PCR, dejar correr el gel 15 minutos más a un voltaje menor. De este modo, la banda del producto PCR y la del control se separarán y se podrá observar perfectamente las dos bandas en esta posición; una muy intensa (específica) y la otra más débil y más corta (control).
5. Algunos carriles del gel van a presentar 2 o más tamaños diferentes de productos PCR. Estos pocillos tienen primers multiplex que van a dar lugar a distintos amplicones según el alelo que esté presente.
6. Los falsos negativos pueden ser causados por
 - o Amplificación no eficiente
 - o Calidad deficiente del DNA
 - o Colocación irregular de la placa PCR en el termociclador.
 - o Temperatura variable entre los pocillos del termociclador.
 - o Calibración inadecuada del termociclador.
7. De manera muy ocasional, pueden aparecer falsos negativos que se deban realmente a alelos todavía sin caracterizar. En tales casos, se recomienda repetir el test usando otras técnicas, como por ejemplo, la secuenciación.
8. El test debe ser repetido si:
 - o No existe amplificación de ningún tipo.
 - o Hay un resultado aparentemente homocigoto o si la pérdida de una reacción cambia una asignación alélica.
 - o Los patrones no dan resultados claros.
 - o Los patrones de reacción muestran la presencia de 3 alelos
 - o El control negativo no es negativo.
9. Si los alelos pueden ser determinados en presencia de una PCR no satisfactoria y ésta no cambia la asignación de los alelos, no es necesario repetir el test.
10. Información detallada de todos los locus HLA y lotes adjunta en los kits.

9. Limitaciones del procedimiento

1. La intensidad de las bandas variará en función de la cantidad y calidad de producto PCR. La calidad del producto afectará directamente a la intensidad de las bandas específicas y de control en el transiluminador UV. En caso de perder todo tipo de señal deberíamos repetir el test.
2. El almacenamiento de las muestras se puede llevar hasta más de un año a -20 °C sin que pierdan calidad ni presenten efectos adversos en los resultados.
3. El correcto funcionamiento del test sólo puede ser garantizado bajo las condiciones de trabajo indicadas en las instrucciones adjuntas.
4. Los kits PROTRANS SSP sólo se deberían usar como fase inicial en el tipaje del DNA. Otras técnicas clínicas deben ser utilizadas junto con esta para determinar la compatibilidad en un trasplante.
5. Los kits PROTRANS SSP no son capaces de resolver todas las combinaciones.

10. Control de calidad

Cada lote producido es contrastado frente a un panel de muestras de DNA representativas. (Ver certificados de análisis para cada lote)

Todos los kits SSP son producidos según las directrices de calidad EN ISO 9001:2003, EN ISO 13485:2000 y apartado IV de IVDD 9879/EG.

11. Problemas y preguntas frecuentes

Problema	Causa posible	Solución
Tubos PCR secos después de la amplificación	Los pocillos no están sellados apropiadamente	Repetir el test sellando los tubos apropiadamente
No se ven bandas en el gel	No hay Bromuro de Etidio	Volver a teñir el gel
	Termociclador no funciona correctamente	Control mediante Protrans Cyclor Check, REF 200 100
		Repetir el test con el termociclador validado(ver 5.2.2). El programa descrito se aplica a los termocicladores recomendados. Otros tienen que ser previamente validados.
	Programa incorrecto	Repetir el test con el programa de amplificación correcto.
	Taq Polimerasa incorrecta	Repetir el test con Taq Polimerasa validada (ver 5.2.2)
	La concentración de DNA es o demasiado alta o demasiado baja	Repetir el test con la concentración adecuada
	DNA degradado (Manchas en los carriles del gel)	Repetir el test con DNA nuevo
	Inhibidores de la PCR en el DNA genómico o DNA impuro, ver 4.2.	Repetir el test con DNA nuevo recién extraído sin sangre (Citrato o EDTA)
Carencia de actividad de la Taq Polimerasa	Repetir el test con DNA conocido para verificar la actividad de la Taq Polimerasa	
Bandas específicas débiles. No existen las bandas de los controles.	Termociclador no funciona correctamente	Control mediante Protrans Cyclor Check, REF 200 100
		Repetir el test con el termociclador validado(ver 5.2.2). El programa descrito se aplica a os termocicladores recomendados. Otros tienen que ser previamente validados.
	El contacto entre la placa y la base del termociclador no es adecuado	El soporte suministrado por PE no debe ser usado en combinación con las placas de PCR de 96 pocillos.
	Inhibidores PCR (heparina, ficoll, etanol) en el DNA genómico impuro Ver 4.2.	Repetir el test con DNA nuevo recién extraído de la muestra adecuada (sangre con citrato y EDTA) Usar aprox. 100 ng/ul de DNA Después de lavar el pellet con wash buffer (etanol), deja la muestra secarse completamente.
	La concentración de DNA es o demasiado alta o demasiado baja	Repetir el test con la concentración adecuada
	DNA degradado (Manchas en los carriles del gel)	Repetir el test con DNA nuevo
	Carencia de actividad de la Taq Polimerasa	Repetir el test con DNA conocido para verificar la actividad de la Taq Polimerasa
No hay bandas específicas	Termociclador no funciona correctamente	Control mediante Protrans Cyclor Check, REF 200 100
		Repetir el test con el termociclador validado(ver 5.2.2). El programa descrito se aplica a os termocicladores recomendados. Otros tienen que ser previamente validados.
	Programa incorrecto	Repetir el test con el programa de amplificación correcto.
	La concentración de DNA es o demasiado alta o demasiado baja	Repetir el test con la concentración adecuada
No hay bandas de control visibles	Termociclador no funciona correctamente	Control mediante Protrans Cyclor Check, REF 200 100
		Repetir el test con el termociclador validado(ver 5.2.2). El programa descrito se aplica a os termocicladores recomendados. Otros tienen que ser previamente validados.
	El contacto entre la placa y la base del termociclador no es adecuado	El soporte suministrado por PE no debe ser usado en combinación con las placas de PCR de 96 pocillos.
Programa incorrecto	Repetir el test con el programa de amplificación correcto.	

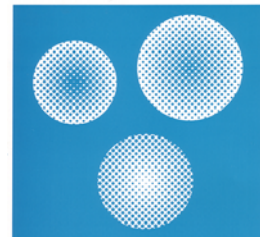
Problema	Causa posible	Solución
No hay bandas de control visibles (Continuación)	Taq Polimerasa incorrecta	Repetir el test con Taq Polimerasa validada (ver 5.2.2)
	En caso de un resultado del tipaje homocigoto	Repetir el test
	DNA no resuspendido uniformemente en el diluyente o en el Mastermix	Vortear perfectamente la muestra del DNA y el Mastermix antes de la PCR y repetir el test Si podemos identificar 2 alelos, no tenemos que tomar ninguna otra medida, pero en los demás casos se recomienda repetir el test
Desaparecen bandas específicas de forma ocasional	Termociclador no funciona correctamente	Control mediante Protrans Cyclor Check, REF 200 100 Repetir el test con el termociclador validado(ver 5.2.2). El programa descrito se aplica a os termocicladores recomendados. Otros tienen que ser previamente validados.
	El contacto entre la placa y la base del termociclador no es adecuado	El soporte suministrado por PE no debe ser usado en combinación con las placas de PCR de 96 pocillos.
	DNA no resuspendido uniformemente en el diluyente o en el Mastermix	Vortear perfectamente la muestra del DNA y el Mastermix antes de la PCR y repetir el test Si podemos identificar 2 alelos, no tenemos que tomar ninguna otra medida, pero en los demás casos se recomienda repetir el test
	Carga incorrecta en el gel de agarosa	Control del gel y de los carriles del gel respecto al Primermix cargados en cada posición
Falsos positivos	Termociclador no funciona correctamente	Control mediante Protrans Cyclor Check, REF 200 100 Repetir el test con el termociclador validado(ver 5.2.2). El programa descrito se aplica a os termocicladores recomendados. Otros tienen que ser previamente validados.
	La concentración de DNA es o demasiado alta	Repetir el test con la concentración adecuada. Concentración de 100 ng/ul
	Exceso de Taq Polimerasa	Repetir la el test con la cantidad de adecuada de Taq Polimerasa. Se recomienda validar cada lote de Taq Polimerasa antes de usarlo de forma rutinaria
	Retraso entre la PCR y el comienzo del ciclo térmico	Comenzar la amplificación después de lanzar la PCR o almacenar las placas a 2°-8°C hasta empezar la amplificación.
	Error en la interpretación de los dímeros como amplificación específica	Supervisar los tamaños de las bandas
	DNA contaminado con otros DNA o otros productos PCR	Separar drásticamente el área pre-PCR del área post-PCR
Bandas borrosas a nivel global y carriles manchados	El gel es demasiado estrecho debido al exceso de calor mientras calentamos	Compensar el volumen perdido añadiendo agua.
	La agarosa no está completamente disuelta	Calentar durante 30 segundos más después de fundirse
	Gel sobrecalentado debido a un elevado voltaje	Disminuir el voltaje
	Señales más intensas en algunos pocillos pueden ser señal de una suspensión irregular de DNA	Usando una pipeta multicanal, mezclar la suspensión 2 ó 3 veces antes de cargarlo en el gel.
	Cargar rápidamente los productos amplificados puede provocar que estos floten y se salgan del pocillo	Cargar tranquilamente y con una pipeta segura
Poca señal en algún carril	El producto sale de la ranura de carga flotando	Introduce y alinea correctamente la punta de la pipeta en la ranura del gel.
La foto sale demasiado oscura	Cantidad elevada de Bromuro de Etidio	Usar 5ul de Bromuro de Etidio (10mg/ml) por cada 100 ml de solución del gel
	La cubeta del gel no es transparente a la luz UV	Sacar la cubeta antes de visualizar el gel. Usar equipo de electroforesis PROTRANS (REF 210 000)
	Ajustes incorrectos de la camara	Aumentar el tiempo de exposición o los ajustes de apertura
La foto sale demasiado clara	Cantidad excesiva de Bromuro de Etidio	Usar 5ul de Bromuro de Etidio (10mg/ml) por cada 100 ml de solución del gel
	Ajustes incorrectos de la camara	Aumentar el tiempo de exposición o los ajustes de apertura

12. Bibliografía

1. U. Forssmann, J. Mytilineos, S. Scherer, and G. Opelz: A method for HLA-DQA Typing by the PCR-SSP Technique. *Transplant Int* 1994, 7: 515-518.
2. J. Mytilineos, M. Lempert, D. Middleton, F. Williams, C. Cullen, S. Scherer, and G. Opelz: HLA Class I DNA Typing of 215 "HLA-A, -B, -DR zero mismatched Kidney transplants". *Tissue Antigens* 1997, 50: 355-358.
3. J. Mytilineos, U. Christ, M. Lempert, and G. Opelz: Comparison of typing results by serology and PCR with sequence specific primers for HLA-Cw in 650 individuals. *Tissue Antigens* 1997, 50: 395-400.
4. J. Mytilineos, M. Lempert, S. Scherer, V. Schwarz, and G. Opelz: Comparison of serological and DNA PCR-SSP typing results for HLA-A and HLA-B in 421 black individuals. *Human Immunology* 1998, 59: 512-517.
5. J.G. Bodmer, S.G.E. Marsh, E.D. Albert et al.: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Human Immunology* V 53: 98-129, March 1997.
6. Amett, K.L. and Parham, P.: HLA Class I nucleotide sequences, 1995. *Tissue Antigens* V 46: 217-257, 1995.
7. Olerup, O. and Zetterquist, H.: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primer (PCR-SSP) in 2 hours. An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens* V 39: 225-235, 1992.
8. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al, Cold Spring Harbour Symposia on quantitative biology, Vol. 51, No.1, p. 263-273; 1986.
9. Bunce, O'Neill, Barnado, Krausa, Browning, Morris, Welsh (1995), Phototyping: comprehensive DNA Typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP), *Tissue Antigens* 46: 355-367.
10. Blasczyk, Hahn, Wehling, Huhn, Salama (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.



DIAGNOSTICA



LONGWOOD S.L.