

Olerup SSP® Instrucciones de uso

Para el diagnóstico *in vitro*

APLICACIONES

Los kits de tipificación de HLA Olerup SSP® son equipos de diagnóstico cualitativo *in vitro* para la tipificación mediante 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 DESCRIPCION

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 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 de los 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, p. ej. 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 producto/s de PCR específico/s. Los tamaños relativos del/de los producto/s de PCR específico/s 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^{1,2}.

Como el proceso de PCR puede verse afectado negativamente por varios factores (p. ej. errores de pipeteado, concentración de ADN demasiado baja, mala calidad del ADN, presencia de inhibidores de la PCR, exactitud del termociclador), se incluye un par de cebadores de control positivo interno en cada reacción de PCR². 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 un/os alelo/s 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 con Taq polimerasa ("mezcla maestra"), sellados adhesivos de PCR y el prospecto del producto, que consta de las instrucciones de uso, información específica del lote y la hoja de trabajo.

Las soluciones del cebador se preparan previamente en alícuotas y se secan en varios 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 H₂O.

Cada placa de tipificación de baja resolución (excepto la baja resolución de DQ) y combi incluye un pocillo de reacción de control negativo que detecta la presencia de productos PCR generados por más del 95% de los amplicones del HLA de clase I Olerup SSP®, DRB, DQB1 y DPB1, así como los amplicones generados por pares de cebadores de control positivo interno.

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*).

Consulte las tablas provistas de especificidad e interpretación específicas del lote o la hoja de trabajo de los alelos HLA específicos amplificados por cada mezcla de cebadores.

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 hoja de datos de seguridad del material (<http://www.olerup-ssp.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.
- Índice de aumento de temperatura de como mínimo 0,7 °C/s.
 Nota: Los kits de Olerup SSP son validados con el termociclador GeneAmp 9700 en modo 9600. Elevadas tasas de incremento de temperatura, mayores que las descritas, pueden tener efectos en los resultados de la tipificación.
- 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 μ L.

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

RECOGIDA Y PREPARACION 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 dH₂O. La relación A260/A280 debe ser de 1,6-2,0 por espectrofotometría UV para una visualización óptima de 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/∞L. **No utilice sangre heparinizada con estos métodos.**

Concentración de ADN recomendada:

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

Si se utiliza ADN extraído por otros métodos,

30 ng/∞L.

Las concentraciones que superen los 50 ng/∞L 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 dH₂O.

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).
4. Prospecto del producto.

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 μ L para añadir la mezcla ADN-mezcla maestra-dH₂O 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 $\leq 0,75$ °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.
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 μ L.
15. Marcador de peso molecular de ADN para cubrir un rango de 50-1.000 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.

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. 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 la/s placa/s 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 50-2.000 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 1.100 pares de base de tamaño.

D. Procedimiento paso a paso

1. Retire de la/s temperatura/s de almacenamiento indicada/s: la cantidad adecuada de muestras de ADN, la/s placa/s de cebadores y el volumen de mezcla maestra necesaria para la/s muestra/s de ADN o la/s placa/s de cebadores seleccionadas. Descongélalas a temperatura ambiente (entre 20 y 25 °C).

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

2. Mezcle brevemente la/s muestra/s de ADN por vórtice.
3. Coloque la/s placa/s de cebadores en un 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 dH₂O 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.
- Kits de baja resolución: utilizando una pipeta manual de un canal, añada 8 µl de la mezcla de mezcla maestra y dH₂O y 2 µl de dH₂O 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 en la mezcla rgradilla de mezcla maestra y dH₂O. (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 µl de la muestra de mezcla de reacción en cada pocillo, excepto en el pocillo de control negativo de la placa de cebadores.
- Kits de alta resolución: utilizando una pipeta manual de un canal, añada la muestra de ADN a temperatura ambiente en la mezcla de mezcla maestra y dH₂O. (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 µl de la muestra de mezcla de reacción en cada pocillo.

Tabla 1: Volúmenes de los componentes necesarios por prueba para varios números de pocillos al utilizar una mezcla maestra que incluya Taq polimerasa.

| N.º de pocillos por prueba | Volumen de mezcla maestra (µl) | Volumen de muestra de ADN (µl) | Volumen de dH ₂ O (µl) | N.º de pocillos por prueba | Volumen de mezcla maestra (µl) | Volumen de muestra de ADN (µl) | Volumen de dH ₂ O (µl) |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 2 | 12 | 8 | 20 | 25 | 87 | 58 | 145 |
| 3 | 15 | 10 | 25 | 26 | 90 | 60 | 150 |
| 4 | 18 | 12 | 30 | 27 | 93 | 62 | 155 |
| 5 | 21 | 14 | 35 | 28 | 96 | 64 | 160 |
| 6 | 24 | 16 | 40 | 29 | 99 | 66 | 165 |
| 7 | 27 | 18 | 45 | 30 | 102 | 68 | 170 |
| 8 | 30 | 20 | 50 | 31 | 105 | 70 | 175 |
| 9 | 33 | 22 | 55 | 32 | 108 | 72 | 180 |
| 10 | 36 | 24 | 60 | 36 | 126 | 84 | 210 |
| 11 | 39 | 26 | 65 | 40 | 138 | 92 | 230 |
| 12 | 42 | 28 | 70 | 44 | 150 | 100 | 250 |
| 13 | 45 | 30 | 75 | 48 | 162 | 108 | 270 |
| 14 | 48 | 32 | 80 | 52 | 174 | 116 | 290 |
| 15 | 51 | 34 | 85 | 56 | 186 | 124 | 310 |
| 16 | 54 | 36 | 90 | 60 | 198 | 132 | 330 |
| 17 | 60 | 40 | 100 | 64 | 210 | 140 | 350 |
| 18 | 63 | 42 | 105 | 68 | 228 | 152 | 380 |
| 19 | 66 | 44 | 110 | 72 | 240 | 160 | 400 |
| 20 | 69 | 46 | 115 | 76 | 252 | 168 | 420 |
| 21 | 72 | 48 | 120 | 80 | 264 | 176 | 440 |
| 22 | 75 | 50 | 125 | 84 | 276 | 184 | 460 |
| 23 | 78 | 52 | 130 | 88 | 288 | 192 | 480 |
| 24 | 81 | 54 | 135 | 92 | 300 | 200 | 500 |
| | | | | 96 | 312 | 208 | 520 |

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 DPB1-DQ-DR

Kit de alta resolución HLA-C

- Agite en vórtice la mezcla maestra.
- Utilizando una pipeta manual de un canal, añada a temperatura ambiente 520 µl de dH₂O 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 y dH₂O y 2 µl de dH₂O 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 206 µl de la muestra de ADN a temperatura ambiente en la mezcla rgradilla de mezcla maestra y dH₂O.
- 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.

6. Cubra la/s placa/s 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.
7. Coloque la/s placa/s 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.
8. Introduzca el número de programa de Olerup SSP®. Especifique un volumen de reacción de 10 µl.
9. Inicie el programa PCR. El programa dura aproximadamente 1 hora y 20 minutos.
10. Extraiga la/s placa/s 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. Fotografíe 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 para laboratorios acreditados, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, normas revisadas definitivas aprobadas por el consejo de administración de ASHI: 31 de agosto de 2007, versión final de la guía de enero de 2008). Se incluye un pocillo de control negativo en los kits de baja resolución de HLA-A, HLA-B, HLA-C y DR, los kits de alta resolución de HLA-C para alelos frecuentes y de alta resolución de DQB1 para alelos frecuentes y en los kits de placa Combi A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ, DPB1-DQ-DR y DQ-DR y en los kits de DQA1*02,05;DQB1*02,03:02 y HLA-B*57:01.

Consulte *Interpretación del gel* en la página 14.

RESULTADOS

Con cada kit se proporcionan hojas de validación de líneas celulares específicas del lote y certificado de análisis.

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 A260/A280 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.

| Método de extracción | Sustancias que interfieren | Concentración de interferencia* |
|-----------------------------|-----------------------------------|--|
| 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 |

6. Las placas de PCR son compatibles con la mayoría de termocicladores del mercado. Vea más abajo la tabla de compatibilidad de los termocicladores. La tabla pretende ser solamente una guía.

| Tabla de compatibilidad | | |
|--------------------------------|------------------------------------|---|
| Fabricante | Termociclador | |
| Biometra | Uno | + |
| | Uno II | + |
| | Tpersonal Cycler | - |
| | T1 Thermocycler | + |
| | T3 Thermocycler | - |
| | TGradient | + |
| | TRobot | + |
| Bio-Rad | Genecycler | - |
| | iCycler™ | + |
| | MyCycler | + |
| Corbett Research | Palm Cycler™ | - |
| Eppendorf | Mastercycler® Gradient | + |
| | MasterCycler EP Gradient | + |
| | M384 | - |
| Ericomp | SingleBlock System | + |
| | TwinBlock System | + |
| | Deltacycler I | + |
| ThermoHybaid | PCR Sprint | - |
| | PCR Express, Px2, PxE | + |
| | MultiBlock System and MBS® | + |
| | Touchdown | + |
| | Omnigene | + |
| | Omn-E | + |
| MJ Research™ | PTC-200 DNA Engine™ | + |
| | PTC-225/220/221 DNA Tetrad™/ Dyad™ | + |
| | PTC-100™ with 96-well block | + |
| MWG | Primus 96 | + |
| | Primus 384 | - |
| | TheQ Lifecycler™ | + |
| ABI | GeneAmp® 2400 | - |
| | Geneamp® 2700\2720 | + |
| | Geneamp® 9600 | + |
| | Geneamp® 9700 | + |
| | Geneamp® 9800 FAST Block | - |
| Stratagene | Robocycler | + |
| Takara | TP 240 | - |
| | TP 3000 | + |
| Techne | TC-412/512 | + |
| | Touchgene Gradient | + |
| | Flexigene | + |
| | Genius | + |
| G-Storm | GS1/GS4/GSX | - |

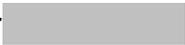
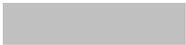
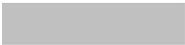
**VALO
RES
PREVISTOS**

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 el/los alelo/s 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 reacción/es PCR fallida/s y esta/s no cambian la asignación de los alelos, no será necesario repetir la prueba.
 - ii. Si, no obstante, la/s reacción/es PCR fallida/s 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 el/los carril/es de control negativo indica la contaminación con producto/s de PCR e invalida todos los resultados de la prueba. En el/los carril/es 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

| | Reacción positiva | Reacción negativa | Fallo en la reacción PCR |
|-----------------------------------|---|---|--|
| 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.

CARACTERISTICAS ESPECIFICAS DEL FUNCIONAMIENTOControl 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 la/s hoja/s de validación de líneas celulares específicas del lote en el prospecto del producto, información específica del lote.

Estudio 1 comparativo de métodos

Fue un estudio multicéntrico en el que se evaluó la concordancia del kit de tipificación de HLA de baja resolución DR Olerup SSP® y la placa de tipificación de ADN de HLA One Lambda Micro SSP™ en tres laboratorios clínicos de los Estados Unidos.

Los resultados de tipificación analizados del kit de tipificación de baja resolución DR Olerup SSP® y de la placa de tipificación de ADN de HLA One Lambda Micro SSP™ mostraron una concordancia del 98,4% (123/125; IC del 95%: 94,3-99,8) al considerar discordantes dos resultados ambiguos de Olerup. La concordancia fue del 100% (123/123; IC del 95%: 97,1-100) cuando en el análisis no se incluyeron los resultados ambiguos de Olerup, reflejo de la práctica clínica normal.

Estudio 2 comparativo de métodos

Este estudio se diseñó para demostrar la concordancia de los resultados de tipificación de baja resolución de alelos de HLA (A, B, C, DQ) obtenidos con los kits de tipificación de HLA en investigación Olerup SSP® y los kits de referencia One Lambda LABType SSO. Se recogieron muestras de sangre total en ACD de 95 sujetos distribuidos en 3 centros clínicos de los Estados Unidos. Se extrajo el ADN y se analizó el ADN purificado resultante con el método de HLA en investigación Olerup SSP® y el de referencia One Lambda LabType SSO.

La concordancia global en alelos de clase I fue del 99,6% (278/279; IC del 95%: 98,0 - 100). En alelos de clase II, la concordancia fue del 100% (94/94; IC del 95%: 96,2 – 100).

Tabla 1

Concordancia global de los resultados de Olerup SSP® y One Lambda SSO para alelos de clase I y de clase II.

| Locus de HLA | Total | |
|--------------------------------|-----------|-----------------------------|
| | n/N | % concordancia (IC del 95%) |
| A | 95 / 95 | 100 (96,2 – 100) |
| B | 90 / 90 | 100 (96,0 – 100) |
| C | 93 / 94 | 98,9 (94,2 – 100) |
| Todos los locus clase I | 278 / 279 | 99,6 (98,0 – 100) |
| Locus clase II (DQ) | 94 / 94 | 100 (96,2 – 100) |

Estudio de reproducibilidad de resultados del kit

En este estudio se compararon los resultados de tipificación HLA de Olerup SSP® entre tres laboratorios de análisis de HLA utilizando un panel de

muestras de ADN caracterizadas en 10 pocillos cuyos resultados de concordancia se incluyen en el banco de ADN de HLA UCLA para HLA de clase I (A, B y C), alelos comunes de clase II (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* y DQB1*) y los alelos de clase II investigados con menos frecuencia (DQA1*, DPA1* y DPB1*).

Tabla 2: Resumen de los resultados de los estudios de reproducibilidad del kit de HLA Olerup SSP®

| Tipo de alelo HLA | % de precisión de tipificación n/N Intervalo de conf. del 95% (LL, UL) | |
|---|--|---|
| | <i>Resultado ambiguo considerado discordante</i> | <i>Resultado ambiguo considerado como indeterminado y excluido del análisis</i> |
| <i>Clase I baja resolución (A y B combinados)</i> | 98,3 (59/60) 91,1, 100 | 100 (59/59) 93,9, 100 |
| <i>Clase I alta resolución (A, B y C combinados)</i> | 94,7 (142/150) 89,8, 97,7 | 98,6 (142/144) 95,1, 99,8 |
| <i>Clase II baja resolución (DRB1* y DRB3*/DRB4*/DRB5*)</i> | 100 (60/60) 94,0, 100 | 100 (60/60) 94,0, 100 |
| <i>Clase II alta resolución - Alelos comunes (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* y DQB1*)</i> | 98,3 (118/120) 94,1, 99,8 | 100 (118/118) 96,9, 100 |
| <i>Clase II alta resolución Alelos investigados con menos frecuencia (DQA1*, DPA1* y DPB1*)</i> | 83,3 (75/90) 74,0, 90,4 | 86,2 (75/87) 77,2, 92,7 |

En este estudio se utilizó un panel de diez (10) muestras de DNA con resultados de tipificación de HLA caracterizado en pocillos.

Las concordancias inferiores observadas para los alelos de alta resolución y clase II investigados con menos frecuencia reflejan la mayor incertidumbre en los "resultados de concordancia" de las muestras de ADN UCLA, teniendo en cuenta la información de secuencia incompleta disponible para los alelos DQA1*, DPA1* y DPB1*. Para 9 de los 11 resultados discordantes observados durante el estudio de reproducibilidad (una determinación de DQA1*0505 por Olerup SSP® frente a "tipificación concordante" de DQA1*0501), los tres centros de análisis lograron el mismo resultado, lo que indica el funcionamiento concordante del kit DQA1* Olerup.

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 de HLA actuales pueden encontrarse en:
 - a. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla> o
 - b. <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

| Problema | Motivo | Acción |
|---|---|---|
| No hay amplificación (ni amplificación de los fragmentos de control interno ni amplificaciones específicas). | Poca cantidad de ADN. | Mida la concentración de ADN y compruebe si la cantidad añadida es correcta. La contaminación de 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), matrices rgradillas 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 ₂ O. |

| Problema | Motivo | Acción |
|---|--|--|
| Continuación: No hay amplificación (ni amplificación de los fragmentos de control interno ni amplificaciones específicas). | 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. |
| Fallo ocasional de la amplificación (caídas). | 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 Olerup SSP® (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. |

| | | |
|--|--|--|
| | La mezcla maestra y la muestra de ADN no se han mezclado bien antes del uso. | Mézcuelas brevemente en vórtice antes de su uso. Recomendamos agitar en vórtice cada fila. |
| | Se ha añadido un volumen desigual de mezcla maestra y ADN en los pocillos. | Realice el pipeteado con más cuidado. |

| Problema | Motivo | Acción |
|---|-----------------------|---|
| Fragmentos de control interno débiles. | ADN impuro. | <p>Mida la calidad del ADN. La relación A260/A280 debe ser de 1,6-2,0 por espectrofotometría UV. La contaminación del ADN 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.</p> |
| | Poca cantidad de ADN. | <p>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 ADN 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.</p> |

| Problema | Motivo | Acción |
|---|--|---|
| Continuación: Fragmentos de control interno débiles. | 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 la mezcla maestra de PCR a -20°C. |
| Amplificación no específica (escaleras o manchas). | 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 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. |

| Problema | Motivo | Acción |
|--|--|---|
| Señales de amplificación cada vez más débiles al cabo del tiempo. | 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. |
| Patrones de amplificación extraños. | 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. |
| | 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. |

| Problema | Motivo | Acción |
|---|---|--|
| Amplificaciones de falsos positivos. | 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-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. |

| Problema | Motivo | Acción |
|---|--|--|
| Continuación: Amplificaciones de falsos positivos. | 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. |
| Amplificaciones de falsos negativos. | 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 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. |

| Problema | Motivo | Acción |
|--|---|--|
| Problemas generales con el gel (geles borrosos y/o carriles manchados). | Muestra de ADN degradado. | Aparece una mancha en los carriles de gel. Aísle 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 viejos. | No cuele los geles demasiado pronto. |
| | 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. |

| Problema | Motivo | Acción |
|---|---|---|
| Problemas generales con falsos negativos en la amplificación o problemas dependientes test-a-test de cualquier naturaleza. | Tasa de incremento de temperatura demasiado alta. | Los kits de Olerup SSP son validados con el termociclador GeneAmp 9700 en modo 9600. 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® es una marca comercial registrada de Olerup SSP AB.

Qiagen™ es una marca comercial de QIAGEN.

GARANTIA

Olerup SSP 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 Olerup SSP 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 Olerup SSP 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 Olerup SSP 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 Olerup SSP AB de daños accidentales o consecuentes.

Este producto no puede reformularse, reenvasarse o revenderse de ningún modo sin el consentimiento por escrito de Olerup SSP AB, Franzengatan 5, SE-112 51 Stockholm, 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 GARANTIA

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

Si se conservan a -20 °C, los cebadores secos se mantienen estables durante 30 meses a partir de la fecha de fabricación.

Si se conservan a -20 °C, la mezcla maestra de PCR con Taq polimerasa se mantiene estable durante 33 meses a partir de la fecha de fabricación.

DIRECCIONES:**Fabricante:**

Olerup SSP AB, Franzengatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sweden.

Tel.: +46-8-717 88 27

Fax: +46-8-717 88 18

Correo electrónico: info-ssp@olerup.com

Sitio web: <http://www.olerup-ssp.com>

Distribuido por:

Olerup GmbH, Löwengasse 47 / 6, AT-1030 Viena, Austria.

Tel.: +43-1-710 15 00

Fax: +43-1-710 15 00 10

Correo electrónico: support-at@olerup.com

Sitio web: <http://www.olerup.com>

Olerup Inc., 901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382

Tel.: 1-877-OLERUP1

Fax: 610-344-7989

Correo electrónico: info.us@olerup.com

Sitio web: <http://www.olerup.com>

Para obtener información sobre los distribuidores de *Olerup SSP* a nivel mundial, póngase en contacto con **Olerup GmbH**.