



imegen

*Bringing
genomics
to health*



Instrucciones de uso

Imegen[®] HLA-B57:01

REF

IMG-306

Fabricado por:

Instituto de Medicina Genómica SL

Agustín Escardino 9,

Parc Científic de la Universitat de València

46980 Paterna (Valencia, España)

+34 963 212 340 - info@imegen.es

imegen.es

Rev. 3. 17/03/2020



AEMPS (N° 2019 09 0061 EN)



Página 1 de 14



imegen

Imegen le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación.

Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

Nuestros productos están diseñados para uso en diagnóstico *in vitro*. Imegen no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Imegen, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. Imegen no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit **imegen-HLA-B57:01** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

Teléfono: 963 212 340

e-Mail: tech.support@imegen.es

***imegen**[®] es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)	
Versión 02	Cambio introducido: Adaptación a los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i> .
Versión 03	Cambio introducido: Actualización apartado 2. Uso previsto



imegen

Índice

1. Información general	4
2. Uso previsto	5
3. Características técnicas	5
4. Advertencias y precauciones de seguridad	6
5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	7
6. Equipos y materiales necesarios que no se suministran	8
7. Protocolo de ensayo	9
7.1 Preparación de las reacciones de amplificación	9
7.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real	9
8. Análisis de los resultados	11
9. Troubleshooting	13
10. Limitaciones	14
10.1 Equipos	14
10.2 Reactivos	14
10.3 Estabilidad del producto	14



imegen

1. Información general

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), localizado en 6p21, contiene cientos de genes del antígeno leucocitario humano (HLA), que codifican glicoproteínas capaces de reconocer péptidos exógenos y/o endógenos en las células del sistema inmune, estimulando la apoptosis celular cuando los péptidos son reconocidos como extraños.

Los genes de este complejo se categorizan en tres grupos: Clase I, Clase II, y Clase III. En humanos, *HLA-B* y dos genes relacionados, *HLA-A* y *HLA-C*, son los genes principales del MHC clase I.

El gen *HLA-B* es una secuencia muy variable, permitiendo al sistema inmune de cada persona reaccionar ante una amplia gama de invasores extraños. Se conocen cientos alelos del gen *HLA-B*, cada uno de los cuales recibe un número particular, como por ejemplo *HLA-B*57*.

Existen diferentes subtipos del alelo *HLA*B57*. En concreto, el subtipo *HLA-B*57:01* está asociado con la hipersensibilidad a Abacavir, un fármaco sintético análogo de los nucleósidos, inhibidor de la transcriptasa inversa, que es utilizado en el tratamiento contra el VIH, causante del SIDA. Los individuos positivos para el alelo **57:01* poseen un alto riesgo a sufrir una reacción severa al fármaco Abacavir y por tanto no se recomienda su uso en tratamiento de estos pacientes.

Referencias

- <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/HLA-B>
- Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases *Nucleic Acids Research* (2015) 43:D423-431



imegen

2. Uso previsto

El kit imegen-HLA-B57:01 permite llevar a cabo un análisis cualitativo mediante PCR a tiempo real, para detectar la presencia del alelo *HLA-B*57:01*. Este kit sirve para determinar la hipersensibilidad a Abacavir, fármaco utilizado en el tratamiento contra el VIH, causante del SIDA.

IMPORTANTE: La finalidad del kit Imegen HLA-B*57:01 no es la de determinar el tipaje tisular para pruebas de histocompatibilidad previas a un trasplante.

Este ensayo emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes en un análisis validado para detectar la presencia del alelo *HLA-B*57:01*, y el gen endógeno *β-globina*, usado como control positivo interno de la muestra de ADN. Los resultados obtenidos de este ensayo confirmarán el diagnóstico del paciente.

El kit **imegen-HLA-B57:01** estudia el genotipo en la línea germinal, por lo que el tipo óptimo de muestra requerido para este análisis es ADN genómico.

El kit **imegen-HLA-B57:01** es sólo para uso diagnóstico in vitro y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

3. Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando muestras de pacientes diagnosticados, proporcionadas por C.H.U. Insular Materno-Infantil (Las Palmas de Gran Canaria, España) y con vectores sintéticos certificados (GenScript) que contienen las secuencias de interés. Este vector se proporciona como control positivo, para verificar el funcionamiento correcto del sistema de PCR. La validación completa proporciona un método de diagnóstico robusto y específico. Fruto de este acuerdo, imegen posee una licencia exclusiva y mundial sobre el *Know-how* de los productos para la fabricación y explotación comercial de los mismos.

El tipo de material necesario para este estudio es ADN genómico procedente de sangre periférica o saliva. La cantidad total de ADN necesario es de 50 ng.

Imegen está certificada frente a la norma **UNE-EN ISO 13485:2018 Productos Sanitarios: Sistemas de Gestión de Calidad – Requisitos para fines reglamentarios** por la AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS para el Diseño, desarrollo y producción de productos sanitarios para diagnóstico in vitro:

- Kits de análisis genético
- Software para análisis bioinformático de datos genéticos



imegen

4. Advertencias y precauciones

1. Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
2. No pipetear con la boca.
3. No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
4. Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
5. No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
6. En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
7. Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
8. Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
9. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
10. Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.
11. El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por imegen.
12. El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por imegen, por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.



imegen

5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 48 determinaciones. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- **HLA-B57 Master Mix:** Master Mix específico de PCR que contiene los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes FAMTM y VIC[®] que permiten la amplificación y detección del alelo *HLA-B*57:01* y del gen *β-globina*.
- **General Master Mix:** Master Mix de PCR con los nucleótidos, MgCl₂, enzima y buffer necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real.
- **Positive Control:** Control positivo para la amplificación simultánea del alelo *HLA-B*57:01* y del gen endógeno *β-globina*.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
HLA-B57 Master Mix	Disco amarillo	2 x 180 µL	-20°C
General Master Mix	Disco blanco	600 µL	4°C
Positive Control	Tapa amarilla	100 µL	-20°C

Tabla 1. Componentes del kit imegen-HLA-B57:01



imegen

6. Equipos reactivos y materiales no suministrados

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real (canales FAM y VIC)
- Micropipetas de 10 μ L, 20 μ L y 200 μ L
- Vortex
- Centrífuga

Reactivos:

- Agua libre de nucleasas

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 μ L, 20 μ L y 200 μ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Material fungible óptico compatible con el termociclador de PCR a tiempo real
- Guantes de látex

6.1 Kits complementarios

Para una detección sensible y específica de otros alelos de HLA con diferentes dianas clínicas, imegen ha desarrollado imegen-HLA-B27 (REF: IMG-289) e imegen-Coeliac (REF: IMG-307).



imegen

7. Protocolo de ensayo

7.1 Preparación de las reacciones de amplificación

1. Descongelar todos los reactivos del kit y el ADN de las muestras.
2. Agitar cada uno de los reactivos en vortex y mantener en frío.
3. En un tubo de 1.5 mL preparar el mix de PCR añadiendo los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad por reacción
HLA-B57 Master Mix	7.5 μ L
General Master Mix	12.5 μ L

Nota: Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

4. Agitar en vortex y dar spin al mix de PCR y dispensar 20 μ L en los correspondientes pocillos del material fungible óptico.
5. Una vez dispensado el mix de PCR añadir a los pocillos correspondientes:
 - 5 μ L de las muestras de ADN genómico (10 ng/ μ L).
 - 5 μ L del control positivo (incluido en el kit).
 - 5 μ L de agua libre de nucleasas (control negativo de PCR).

Nota: Se recomienda añadir un control negativo de PCR para descartar la contaminación de los reactivos, y también un control positivo para asegurar el correcto funcionamiento de la reacción de PCR.

6. Colocar los tubos o placas en el termociclador de PCR a tiempo real y configurar el programa de amplificación tal y como se indica en el siguiente apartado.

7.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real

- Tipo de experimento: Quantification-Standard Curve
- Velocidad de rampa: Standard
- Volumen de reacción: 25 μ L
- Referencia basal ROX™: incluida



imegen

- Fluoróforos de las sondas TaqMan®:

Sonda	Receptor	Genotipo	Quencher
HLA-B57-P	FAM™	Alelo <i>HLA-B*57:01</i>	MGB
B-Globina-P	VIC™	<i>β-Globina</i>	MGB

Tabla 2. Información de la sonda

- Programa óptimo:

Campos	Etapa 1	Etapa 2	
	Activación enzimática	PCR	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	36 ciclos	
		Desnaturalización	Unión de oligonucleótido/ Extensión
Temperatura	95°C	95°C	64°C
Tiempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto*

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para 7500 FAST, StepOne (Thermo Scientific)

**Detección de la fluorescencia*



imegen

8. Análisis de resultados

Para un correcto análisis de los resultados se recomienda seguir las siguientes indicaciones:

- Para analizar las muestras hay que emplear un software específico del termociclador de PCR a tiempo real utilizado.
- Comprobar que en el control negativo de PCR no hay amplificación, ni en el canal FAM ni en el canal VIC.
- Comprobar que en el control positivo hay señal de amplificación tanto en el canal FAM como en el canal VIC.
- Asegurarse de que todas las muestras, positivas o negativas, muestren señal positiva en el canal VIC, procedente de la amplificación del gen endógeno β -Globina.

A continuación se muestran los posibles resultados obtenidos con el kit **imegen-HLA-B57:01**.

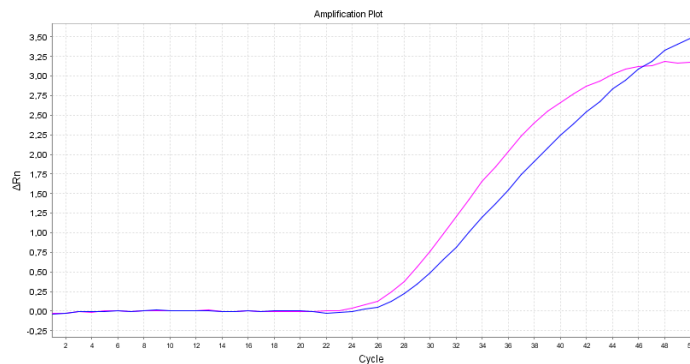


Figura 1. Resultado obtenido a partir de una muestra positiva. Se observa señal en ambos canales: FAM (azul) y VIC (rosa).

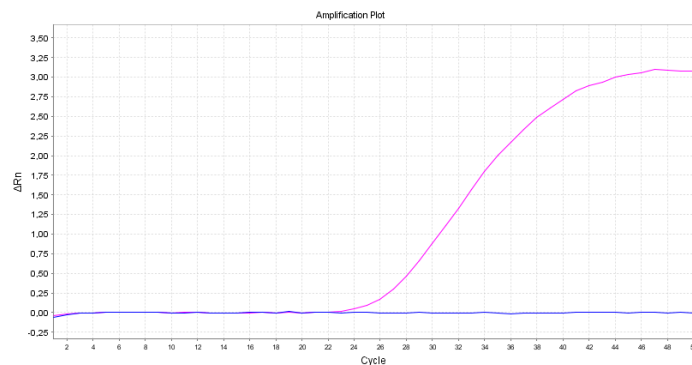


Figura 2. Resultado obtenido a partir de una muestra negativa. Sólo se observa señal de amplificación en el canal VIC (rosa), procedente del gen endógeno β -globina.

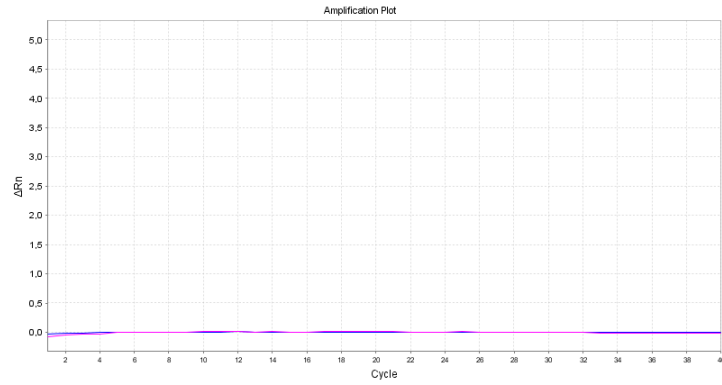


Figure 3. Resultado obtenido a partir del control negativo de PCR. No se observa señal de amplificación en ningún canal.



imegen

9. Troubleshooting

La tabla que aparece a continuación especifica los resultados que podrían obtenerse del análisis de los diferentes controles y una muestra en un ensayo, así como su interpretación.

Muestra	HLA-B*57:01 (FAM)	B-globina (VIC)	Causa
Control Positivo	+	+	Resultado esperado
	-	-	Fallo de amplificación en la PCR ¹
	+	-	
	-	+	
Muestra	+	+	Resultado esperado
	-	+	Fallo de amplificación en la PCR ¹
	+	-	
	-	-	Fallo de amplificación de la muestra ²
Control Negativo de PCR	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con ADN humano ³

Tabla 4. Interpretación de los posibles resultados obtenidos mediante el uso del kit imegen-HLA-B57:01

- ¹ **Fallo de amplificación en la PCR:** Compruebe el programa de amplificación y la configuración de captura de la fluorescencia. Un fallo en la amplificación puede deberse a un problema técnico en la configuración del programa de PCR.
- ² **Fallo de amplificación de la muestra:** Compruebe que la cuantificación de la muestra es la recomendada, si fuese así el resultado especificado puede deberse a que la muestra se encuentre altamente degradada.
- ³ **Contaminación de la PCR con ADN de humano:** La contaminación de la PCR puede deberse a un manejo equivocado de la muestra, al uso de reactivos contaminados o a contaminación de origen ambiental. Limpie minuciosamente el laboratorio donde se ha preparado la PCR, así como los equipos y el material utilizados. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR. Prepare en último lugar la reacción de PCR que contiene el control positivo, con el fin de evitar la contaminación cruzada. En este caso se recomienda repetir el ensayo.



imegen

10. Limitaciones

10.1 Equipos

Imegen-HLA-B57:01 ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- 7500 FAST Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
- StepOne Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)

Si usa otra marca o modelo de termocicladores, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro servicio técnico para cualquier consulta o aclaración.

10.2 Reactivos

Imegen-HLA-B57:01 se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual (Equipos y materiales necesarios que no se suministran).

10.3 Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.