

**IVD****Sólo para uso profesional***Kit de genotipado HLA-B27 por PCR en tiempo real***MANUAL DEL USUARIO**

"DNA-Technology Research &  
Production", LLC

Rusia, 142281, Región de Moscú,

Protvino, calle  
Zheleznodorozhnaya 20  
Teléfono/fax:+7(495) 640.17.71

Correo electrónico: [info@dna-technology.com](mailto:info@dna-technology.com)  
<http://www.dna-technology.ru>

Servicio de atención al cliente Correo electrónico:  
[hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru)

**REF**

R1-H004-23/4INT, R1-H004-S3/4INT,  
R1-H004-N3/4INT

**VER**

561.2018.12.27

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>1. USO PREVISTO</b>	<b>3</b>
<b>2. MÉTODO</b>	<b>3</b>
<b>3. CONTENIDO</b>	<b>4</b>
<b>4. REACTIVOS Y EQUIPOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS</b>	<b>5</b>
<b>5. CONDICIONES DE TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO</b>	<b>5</b>
<b>6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES</b>	<b>6</b>
<b>7. MUESTRAS</b>	<b>7</b>
<b>8. PROCEDIMIENTO</b>	<b>7</b>
<b>9. CONTROLES</b>	<b>9</b>
<b>10. ANÁLISIS DE DATOS</b>	<b>9</b>
<b>11. ESPECIFICACIONES</b>	<b>11</b>
<b>12. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS</b>	<b>12</b>
<b>13. CONTROL DE CALIDAD</b>	<b>12</b>
<b>14. GUIA DE SÍMBOLOS</b>	<b>13</b>

## 1. USO PREVISTO

El kit de **genotipado HLA-B27 REAL-TIME PCR** está destinado a aplicaciones de investigación y diagnóstico. El **kit de genotipado HLA-B27 REAL-TIME PCR** es un producto *in vitro* basado en pruebas de ácido nucleico. El kit de **genotipado HLA-B27 REAL-TIME PCR** está destinado a la detección rápida y específica de los alelos HLA-B27 (complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, B) por el método de PCR en tiempo real. Las muestras son materiales biológicos humanos: sangre periférica.

Estos alelos son generalmente reconocidos como un marcador genético de múltiples condiciones de enfermedad, por ejemplo, la artritis reumatoide y la espondilitis anquilosante (enfermedad de Bekhterev).

Indicaciones de uso:

- la presencia de síntomas clínicos de espondiloartropatías: dolor de espalda inflamatorio, asimetría oligoartritis periférica, principalmente de las extremidades inferiores, enteritis y/o tendosinovitis;
- como indicador de laboratorio adicional para predecir la gravedad de las espondiloartropatías.

La aplicación del kit no depende de aspectos poblacionales y demográficos. No hay contraindicaciones para el uso del **kit de genotipado HLA-B27 por PCR en tiempo real**.

El **kit de genotipado de HLA-B27 por PCR en tiempo real** puede utilizarse en laboratorios clínicos y de diagnóstico de instituciones médicas y en la práctica de la investigación.

Usuarios potenciales: personal cualificado en métodos de diagnóstico molecular y en el trabajo con microorganismos patógenos y que trabaja en el laboratorio clínico y de diagnóstico.

Es necesario aplicar el kit sólo como se indica en este manual de usuario.

## 2. MÉTODO

Método: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con detección de los resultados en tiempo real; análisis cualitativo

El método de PCR implementado se basa en la amplificación de una secuencia de ADN objetivo. Para aumentar la sensibilidad y la especificidad de la reacción de amplificación, se usa un arranque en caliente. El arranque en caliente se consigue mediante la preparación de la mezcla de reacción que consiste en dos capas separadas por una capa de parafina. La reacción en cadena de la polimerasa se inicia sólo cuando se funde la parafina. Esto excluye las alineaciones no específicas de los cebadores con el ADN diana en el calentamiento inicial del tubo.

El **kit de genotipado HLA-B27 REAL-TIME PCR** se basa en la modificación fluorescente del método PCR. La mezcla de PCR contiene dos sondas específicas de la diana que llevan fluoróforos reporteros y moléculas quencher. Una vez hibridadas con una secuencia diana, las sondas se activan. Como resultado de la activación, la fluorescencia aumenta proporcionalmente a la amplificación de la secuencia diana. La intensidad de la fluorescencia se mide en cada ciclo de reacción con una unidad de recogida de datos de PCR en tiempo real y se analiza con el software suministrado.

La mezcla PCR incluye el control interno (IC B27). El IC B27 sirve como control de la calidad de la muestra y permite evaluar la cantidad de ADN genómico. Es necesario para asegurar la calidad de la PCR y la suficiencia del ADN. El uso del control interno permite evitar resultados falsos negativos en caso de que la cantidad de ADN de la muestra sea insuficiente para el análisis.

La sonda de ADN utilizada para la detección del producto de amplificación HLA-B27 incluye el fluoróforo Fam. La sonda de ADN utilizada para la detección del producto de amplificación del control interno incluye el fluoróforo Hex. La aplicación de dos fluoróforos permite registrar los resultados de diferentes reacciones de amplificación que tienen lugar simultáneamente en un tubo. La Tabla 1 muestra los canales de detección de los productos de amplificación.

Tabla 1. Canales de detección de los productos de amplificación

Fam/Verde	Hex/Amarillo	Rox/Naranja	Cy5/Rojo	Cy5.5/Crimson
HLA-B27	IC B27	-	-	-

El análisis automático está disponible en los instrumentos "DNA -Technology": **DTlite** o **DTprime Real-time Thermal Cyclers** for **HLA-B27 REAL-TIME PCR Genotyping Kit** (véase el catálogo en [www.dna-technology.ru/en](http://www.dna-technology.ru/en) para ver las opciones de suministro disponibles).

La versión actual del software está disponible para su descarga en <http://www.dna-technology.ru/eng/support/>.

### 3. CONTENIDO

El contenido del **kit de genotipado HLA-B27 por PCR en tiempo real** está representado en la Tabla 2 y la Tabla 3.

Tabla 2. Contenido del kit de genotipado HLA-B27 por PCR en tiempo real, paquete S (estándar) para R1-H004- 23/4EU y R1-H004-S3/4EU

Reactivo	Descripción	Volumen total	Cantidad
Mezcla de PCR sellada en parafina	Líquido incoloro y transparente bajo la fracción blanca de cera	960 µL (20 µL por tubo)	48 tubos o 6 de 8 tubos tiras
Taq-polimerasa	Líquido incoloro y transparente	500 µL	1 tubo
Aceite mineral	Incoloro transparente líquido aceitoso y viscoso	1 ml	1 tubo
Control positivo	Líquido incoloro y transparente	75 µL	1 tubo

Tabla 3. Paquete U (universal) para R1-H004-N3/4EU

Reactivo	Descripción	Volumen total	Cantidad
PCR-mix	Incoloro transparente líquido	960 µL	1 tubo
Buffer PCR	Incoloro transparente líquido	500 µL	1 tubo
Polimerasa TechnoTaq MAX	Incoloro transparente líquido	24 µL	1 tubo
Aceite mineral	Incoloro transparente líquido aceitoso y viscoso	1 ml	1 tubo
Control positivo	Incoloro transparente líquido	75 µL	1 tubo

El **kit de genotipado HLA-B27 por PCR en tiempo real** está diseñado para 48 pruebas que incluyen el análisis de Muestras desconocidas, muestras de control positivo y muestras de control negativo.

#### **4. REACTIVOS Y EQUIPOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS**

##### **4.1. Recogida de muestras**

Se requiere un equipo de toma de muestras de sangre. Por favor, utilice sólo EDTA como anticoagulante, ya que otras sustancias pueden proporcionar la inhibición de la PCR.

##### **4.2. Extracción de ADN y PCR**

- Cabina de seguridad biológica clase II;
- Cabina de PCR UV;
- Refrigerador;
- Mezclador vortex;
- Tubos de 0,2, 0,5 y 1,5 ml;
- Gradilla para tubos de PCR de 0,2 y 1,5 ml;
- Pipetas monocal (rango de volumen 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 100-1000 µl);
- Puntas de pipeta con filtro libres de RNasa y DNasa (rango de volumen 20 µl, 50 µl, 200 µl, 1000 µl);
- Guantes quirúrgicos sin polvo;
- Solución desinfectante;
- Contenedor para las puntas de pipeta usadas;
- Kit de extracción de ácido nucleico ("DN-Tecnología" hecho PREP-GS Genetics **REF** P-023/4EU o PREP-RAPID Genetics **REF** P-021/4EU);
- Cabina de seguridad biológica (microbiológica) clase II;
- Centrífuga de alta velocidad (RCF 13000 g);
- Baño seco Termostatado (rango de temperatura 65-98°C);
- Aspirador con frasco trampa para eliminar los sobrenadantes;
- Solución salina fisiológica al 0,9% de NaCl (estéril);
- Termociclador PCR en tiempo real

##### **Software:**

La versión más reciente del software de los termocicladores de PCR en tiempo real DTprime y DTlite puede descargarse de <http://www.dna-technology.ru/eng/support/>;

Ini-file HLA\_B27\_es\_#20180118.

Sistema operativo compatible: todas las versiones de Windows a partir de la 7.

#### **5. CONDICIONES DE TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO**

Fecha de caducidad: 12 meses a partir de la fecha de producción.

Todos los componentes del **Kit de genotipado PCR en tiempo real HLA-B27**, excepto la polimerasa TechnoTaq MAX, deben almacenarse a temperaturas entre 2°C y 8°C. La PCR-mix debe almacenarse a temperaturas de 2°C a 8°C protegida de la luz. La temperatura y la luz excesivas pueden ser perjudiciales para el rendimiento del producto. La polimerasa TechnoTaq MAX debe almacenarse a temperaturas de -18°C a -22°C.

El kit puede ser transportado a temperaturas de 2 °C a 8 °C. Se permite transportar la TechnoTaq MAX polimerasa a temperaturas de 2 °C a 8 °C durante no más de 5 días.

Duración del kit una vez abierto:

- los componentes del kit deben almacenarse a temperaturas de entre 2 °C y 8 °C

- La mezcla de PCR para la amplificación debe almacenarse a temperaturas de entre 2 °C y 8 °C protegida de la luz;
- La polimerasa TechnoTaq MAX debe almacenarse a temperaturas entre -18 y -22 °C

Los kits almacenados en de forma inadecuada no deben utilizarse.

No debe utilizarse un **kit de genotipado HLA-B27 por PCR en tiempo real** caducado.

Se recomienda seguir las instrucciones dadas para obtener resultados precisos y confiables.

La conformidad del **kit de genotipado PCR en tiempo real HLA-B27** con los requisitos técnicos prescritos está sujeta al cumplimiento de las condiciones de almacenamiento, transporte y manipulación recomendadas por el fabricante.

Póngase en contacto con nuestro representante oficial en la UE por problemas de calidad del **Kit de genotipado PCR en tiempo real HLA-B27**.

Si se enfrenta a cualquier problema no descrito, póngase en contacto con el departamento de atención al cliente en relación con los problemas de calidad del kit:

Soporte técnico Correo electrónico: [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru), [www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru).

## **6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

Manipule y elimine todas las muestras biológicas, reactivos y materiales utilizados para llevar a cabo el ensayo como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Evite el contacto directo con las muestras biológicas, los reactivos y los materiales utilizados para realizar el ensayo. Utilizar guantes quirúrgicos sin polvo. Evitar que se produzcan derrames o aerosoles. Todo el material que se exponga a las muestras biológicas debe ser tratado durante al menos 30 minutos con una solución desinfectante o ser esterilizado en autoclave durante 1 hora a 121°C antes de su eliminación.

Los procedimientos de biología molecular, como la extracción de ácidos nucleicos, la transcripción inversa, la amplificación y la detección, requieren personal cualificado para evitar el riesgo de resultados erróneos, especialmente debido a la degradación de los ácidos nucleicos contenidos en las muestras o a la contaminación de las mismas por los productos de amplificación.

Todos los componentes de oligonucleótidos son producidos por tecnología de síntesis artificial según el protocolo de control de calidad interno y no contienen sangre ni productos del procesamiento de la sangre.

El control positivo se produce mediante la tecnología de síntesis artificial de ADN. El control positivo no incluye partes de agentes infecciosos.

Todas las soluciones líquidas están diseñadas para un solo uso y no pueden utilizarse más de una vez en reacciones de amplificación. Los tubos de plástico no contienen f-talatos. No inhalar los gases/humos/vapores/spray producidos por los componentes del kit. No comer/beber los componentes del kit. Evitar el contacto con los ojos. Utilizar únicamente los reactivos suministrados en el kit y los recomendados por el fabricante. No mezclar reactivos de diferentes lotes. No utilice reactivos de kits de otros fabricantes. Todo el material de laboratorio, incluidas las pipetas, las gradillas para tubos de ensayo, el material de vidrio de laboratorio, las batas de laboratorio, etc., así como los reactivos, deben estar estrictamente inmóviles. No está permitido trasladarlos de una sala a otra. Retire los residuos de la PCR sólo de forma cerrada. No abra los tubos después de la amplificación. Los materiales de desecho se eliminan de acuerdo con las normas locales y nacionales. Todas las superficies del laboratorio (mesas de trabajo, estantes para tubos de ensayo, equipos, etc.) deben tratarse diariamente con una solución desinfectante.

### Acciones de emergencia

**Inhalación:** La inhalación de la mezcla maestra contenida en este kit es poco probable, sin embargo, se debe tener cuidado.

**Contacto con los ojos:** Si algún componente de este kit entra en contacto con los ojos, lávelos suavemente con agua corriente potable durante 15 minutos o más, asegurándose de mantener los párpados abiertos. Si se produce dolor o irritación, obtenga atención médica.

**Contacto con la piel:** Si algún componente de este kit entra en contacto con la piel y causa molestias, retire cualquier ropa contaminada. Lavar la zona afectada con abundante agua y jabón. Si se produce dolor o irritación, obtener atención médica.

**Ingestión:** Si se ingiere cualquier componente de este kit, lavar la boca con agua. Si se produce irritación o malestar, obtenga atención médica.

No utilice el kit:

- Cuando se incumplen las condiciones de transporte y almacenamiento;
- Cuando el aspecto de los reactivos no corresponde con la descripción del kit
- Cuando el embalaje de los componentes del kit se rompe;
- Después de la fecha de caducidad prevista.

NO se han visto efectos adversos significativos para la salud por el uso rutinario de este kit si se siguen las instrucciones indicadas en el presente manual.

## 7. MUESTRAS

El kit de genotipado *HLA-B27* por PCR en tiempo real está diseñado para detectar el ADN extraído de la sangre periférica.

El muestreo, los procedimientos de procesamiento de la muestra y el almacenamiento se llevan a cabo de acuerdo con las instrucciones del kit de extracción de ADN de material biológico.

La toma de muestras de sangre periférica se realiza en un tubo de plástico al vacío. Pueden ser tubos de recogida de sangre Vacuette de 2,0 o 4,0 ml con anticoagulante, por ejemplo sal disódica de etilendiaminotetraacetato (EDTA) a una concentración final de 2,0 mg/ml. Es aceptable el uso de citrato de sodio como anticoagulante. Después de tomar el material, es necesario mezclar la sangre con el anticoagulante mezclando el tubo 2 - 3 veces.

Las muestras pueden almacenarse a temperaturas de entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de 24 h. Cuando sea imposible entregar el material en el laboratorio durante el día, se permite una única congelación del material. El material congelado se puede almacenar a una temperatura de menos 20 °C durante un mes.



La descripción detallada de los procedimientos de muestreo y procesamiento de las muestras, así como los requisitos de almacenamiento y transporte de las mismas, citados en los manuales de usuario de los kits de extracción PREP-GS Genetics y PREP-RAPID Genetics.

## 8. PROCEDIMIENTO

La extracción de ADN se realiza según las instrucciones del kit de extracción. Se recomiendan los kits de extracción PREP-GS GENETICS y PREP-RAPID GENETICS. El kit de extracción PREP-GS GENETICS está pensado para el almacenamiento a largo plazo del ADN extraído (hasta 6 meses). El ADN extraído con ayuda del Kit de Extracción PREP-RAPID GENETICS no debe almacenarse más de un mes.



Independientemente del kit de extracción de ADN utilizado, una muestra de control negativo debe pasar por todas las etapas de la extracción de ADN. La solución salina fisiológica puede utilizarse como control negativo en muestra en los volúmenes indicados

**Procedimiento de ensayo para el paquete S:**

1. Marque el número necesario de tubos de 0,2 mL con la mezcla de PCR para cada muestra a analizar, para el control positivo (C+), para el control negativo (C-).  
Ejemplo: para analizar 4 muestras en una ejecución de PCR, marque 4 tubos con PCR-mix para las muestras, 1 tubo para "C-" y 1 tubo para "C+". El número de tubos resultante es 6.
2. Agitar el tubo con la solución de Taq-polimerasa durante 3-5 segundos y centrifugar durante 1-3 segundos para recoger las gotas.
3. Agregue 10,0 µL de solución de Taq-polimerasa en cada tubo. Evitar la rotura de la capa de parafina.
4. A continuación, siga los pasos indicados en las páginas 8-13 para el paquete U.

**Procedimiento de ensayo para el paquete U:**

1. Marcar el número necesario de tubos de 0,2 mL para cada muestra a analizar, para el control positivo (C+) y para el control negativo (C-).  
Ejemplo: para el análisis simultáneo de 4 muestras en una ejecución de PCR, marque 4 tubos con PCR-mix para las muestras, 1 tubo para "C-" y 1 tubo para "C+". El número de tubos resultante es 6
2. Agite el tubo con PCR-mix durante 3-5 segundos y centrifugar durante 1-3 segundos para recoger las gotas
3. Vierta 20,0 µL de PCR-mix en los tubos marcados.
4. Agitar los tubos con el búfer de PCR y la polimerasa TechnoTaq MAX durante 3-5 segundos y centrifugar durante 1-3 segundos para recoger las gotas.



La polimerasa TechnoTaq MAX debe almacenarse a temperaturas comprendidas entre 18°C y 22°C bajo cero. La exposición a la temperatura ambiente sólo se permite durante un corto período de tiempo. Sacar del congelador justo antes de su uso y colocar en hielo.

5. Prepare la mezcla de búfer de PCR y la polimerasa TechnoTaq MAX.



La mezcla del búfer de PCR y la polimerasa TechnoTaq MAX debe prepararse justo antes de su uso.

Añadir en un tubo:

- $10 \times (N+1)$  µL de búfer de PCR,
  - $0,5 \times (N+1)$  µL de TechnoTaq MAX polimerasa,
- N - número de los tubos marcados, incluyendo "C-" y "C+".

Ejemplo: para la cata simultánea de 5 muestras, "C-" y dos "C+" en una sola tirada de PCR. Marque 7 tubos (5 tubos para las muestras a probar, 1 tubo para "C+" y 1 tubo para "C-"). Prepare la mezcla de búfer de PCR y TechnoTaq MAX polimerasa para 8 (7+1) tubos. Mezclar 80 µL de PCR-buffer y 4 µL de TechnoTaq MAX polimerasa.

6. Agite el tubo con la mezcla preparada durante 3-5 segundos, luego centrifugar durante 1-3 segundos para recogerlas gotas.
7. Agregue 10 µL de búfer de PCR y mezcla de polimerasa TechnoTaq MAX en cada tubo de PCR.



Siga los pasos indicados en las págs. 8 - 13 dentro de las dos horas siguientes a la adición del búfer de PCR y Mezcla de polimerasa TechnoTaq MAX a la mezcla de amplificación.

8. Agregue una gota (20,0 µL) de aceite mineral en cada tubo. Cerrar bien los tubos.
9. Agregue 5,0 µL de muestra de ADN a los tubos de PCR correspondientes. Evitar la rotura de la capa de parafina. Abrir el tubo, añada la muestra de ADN y luego cierre el tubo antes de pasar a la siguiente muestra de ADN para evitar la contaminación. Utilice puntas con filtro. No añada ADN en los tubos "C-", "C+".
10. Agregue 5,0 µL de control negativo que haya superado todos los pasos del procedimiento de extracción de ADN en tubos "C-". dd 5,0 µL de control positivo en tubos "C+". Evitar la rotura de la capa de parafina.
11. Centrifugar los tubos brevemente (1-3 segundos).

12. Coloque los tubos en el termociclador. Se recomienda disponer los tubos en el centro del termobloque.
13. Inicie el software Real-time Thermal Cyler y elija el modo de operación Device.. Cargue el archivo ini "HL \_B27\_es\_#20180118" antes de la primera ejecución. Agregue la prueba "HL \_B27" en las ejecuciones posteriores. Especifique el número y el identificador de las muestras, incluidas las muestras de control negativo y positivo. Defina la posición de los tubos en la interfaz del software de acuerdo con la posición en la que fueron fijados en la unidad térmica. Ejecute la PCR. Véase la tabla 4

Seleccionar la prueba "HL \_B27", la Tabla 4 debería aparecer en la ventana "Iniciar ejecución".

Tabla 4. El programa PCR para los termocicladores DTlite y DTprime

Paso	Temperatura, °C	Min.	S.	Número de ciclos	Óptica medición	Tipo de paso
1	80	0	30	1		Ciclo
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Ciclo
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Ciclo
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Ciclo
5	10	.	.	Holding		Holding

## 9. CONTROLES

El kit de genotipado *HLA-B27 por PCR en tiempo real* contiene una muestra de control positivo. El control positivo es una parte clonada del gen detectado por la ayuda del kit. Se produce con técnicas de ingeniería genética y se caracteriza por la secuenciación automática del ADN. La mezcla de PCR del kit incluye el control interno (IC). El IC es un plásmido artificial destinado a evaluar la calidad del rendimiento de la PCR. Para revelar una posible contaminación se requiere un control negativo.



Una muestra de control negativo debe pasar por todas las etapas de la extracción de ADN. La solución puede utilizarse como muestra de control negativo en los volúmenes indicados en las instrucciones suministradas.

El resultado de la prueba se considera válido cuando el software muestra un gráfico con la intensidad de la fluorescencia del número de ciclo para cada tubo del termobloque. La tabla mostrará el ID de la muestra y los valores de Cp para Fam y Hex.

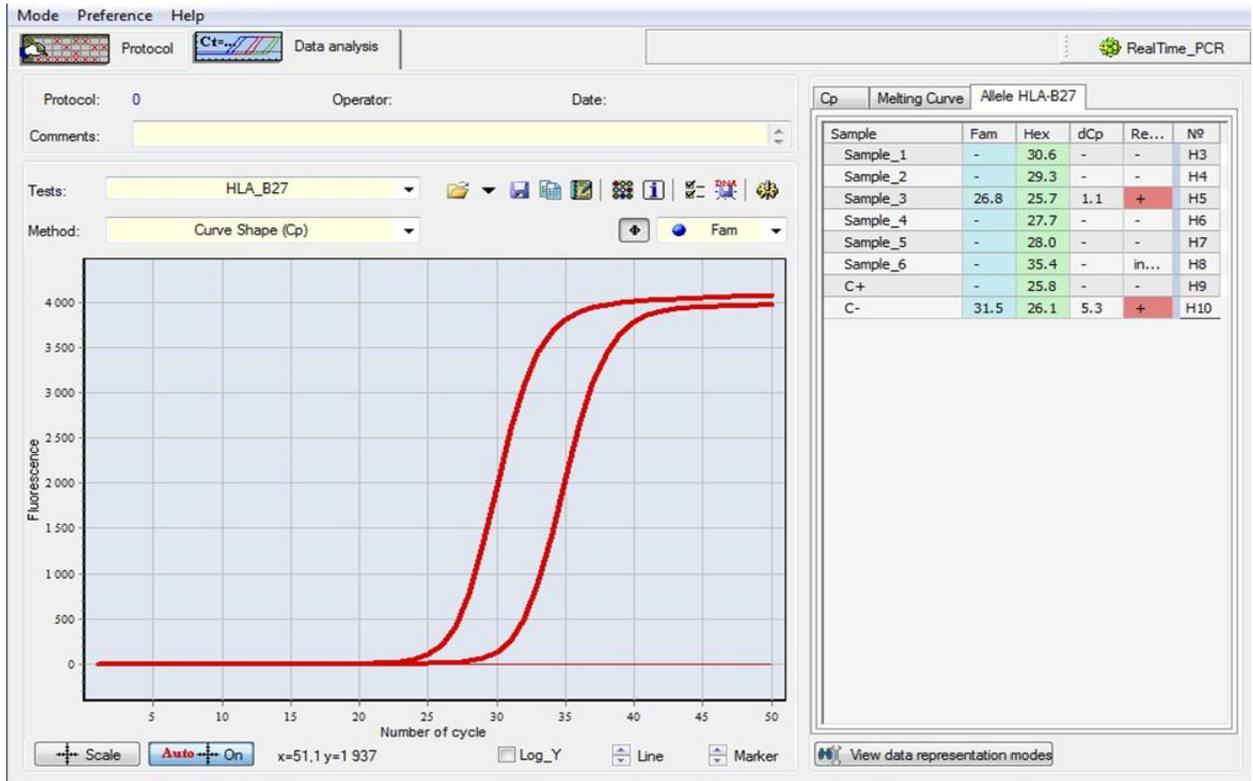
El resultado de la prueba se considera inválido cuando el Cp de Hex es superior a 32 o está ausente.

Si el control positivo (C+) no tiene la señal, es necesario repetir toda la prueba. Puede ser causado por inhibidores, error de operación o condiciones inadecuadas de almacenamiento y manejo.

Si la señal del control negativo (C-) está presente, todos los resultados de la ejecución de la PCR actual se consideran falsos. Se requiere una descontaminación.

## 10. ANÁLISIS DE DATOS

Registro de los resultados de la PCR en modo automático. El gráfico mostrará la fluorescencia del número de ciclos para cada tubo del termobloque. La tabla mostrará el identificador de la muestra y los valores de Cp para Fam y Hex.



La interpretación del resultado de cada muestra se realiza automáticamente con respecto a los valores de Cp para los canales Fam (etiqueta de colorante específico) y Hex (etiqueta de colorante de control interno).

### HLA\*B27 gene detection



Tube number:  
Patient:  
Sex:  
Age:  
Physician:  
Comment:

Information about laboratory

Sample ID: C+

Name of research	Result
allele HLA-B27	Detected

Study was carried out by

Date  
Signature

Tabla 5. Valores Cp de los canales Fam y Hex utilizados para la interpretación de los resultados de la PCR (sólo para los instrumentos DTlite o DTprime)

Fam (Fam Cp)	Hex (Hex Cp)	$\Delta Cp = Cp (Fam) - Cp (Hex)$	Interpretación
Se define Cp	$Cp \leq 32,0^*$	Menos de 8,0 (positivo)	Se detecta HLA-B27
Se define Cp	$Cp \leq 32,0$	Más de 10,0 (negativo)	No se detecta el HLA-B27
Cp no está definido $Cp \leq 32,0$	$Cp \leq 32,0$	No se considera	
Se define Cp	$Cp \leq 32,0$	8,0 - 10,0	No es confiable
Cp es definido/no está definido	Cp no está definido	No se considera	No es confiable
	$Cp > 32,0$	No se considera	

\*corresponde a 1,0 ng de ADN genómico por tubo de amplificación

En caso de obtener resultados poco fiables, debe repetirse el procedimiento a partir de la etapa de amplificación de la PCR. Si una nueva prueba confirma el resultado no confiable, se debe repetir el procedimiento de extracción de ADN y de amplificación de la PCR o/y de toma de muestras (se realiza de forma secuencial).

Un resultado poco fiable puede estar relacionado con la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra de ADN, la realización incorrecta del protocolo de análisis, inadecuada temperatura de amplificación, etc.



Si la muestra de ADN se ha obtenido con el kit de extracción de DN PREP-RAPID GENETICS y  $\Delta Cp = Cp (Fam) - Cp (Hex)$  si el valor se encuentra dentro del rango 8.0-10.0, la muestra de ADN debe diluirse 10 veces con agua destilada. Tenga en cuenta que el valor de Cp por el canal Hex cambiará. En este caso el resultado debe considerarse fiable cuando  $Cp < 35.0$ .

La muestra de control positivo debe contener el alelo HLA-B27. Si la muestra de control positivo tiene un resultado negativo o poco confiable, los resultados de todo el ciclo de PCR se consideran poco fiables. En este caso, es necesario repetir el paso de amplificación de la PCR para las muestras en la corrida de PCR actual.

La muestra de control negativo debe tener un resultado no fidedigno. Si se obtienen valores diferentes, se considera que los resultados de toda la ejecución de la PCR no son fiables. En este caso, es necesario llevar a cabo medidas especiales para eliminar la contaminación.

## 11. ESPECIFICACIONES

a. La **especificidad** analítica del kit de genotipado HLA-B27 por PCR en tiempo real se evaluó mediante análisis bioinformático utilizando las bases de datos en línea disponibles con información genética completa y actualizada. Los oligonucleótidos específicos utilizados en la prueba se cotejaron con las secuencias de la base de datos GenBank. Ninguna de las secuencias mostró suficiente similitud para la detección inespecífica.

Si las muestras contienen el alelo HLA-B27 en estado homocigoto o heterocigoto, se registra un resultado positivo a través de los canales Fam y Hex, siempre que  $CP Hex \leq 32$  y  $\Delta CP = CP (Fam) - CP (Hex)$  sea inferior a 8,0.

Si las muestras no contienen el alelo HLA-B27, se registra un resultado negativo a través del canal FAM y un resultado positivo a través del canal Hex ( $CP Hex \leq 32$ ), o se registra un resultado positivo a través de los canales Fam y Hex, siempre que  $CP (Hex) \leq 32$  y  $\Delta CP = CP (Fam) - CP (Hex)$  sea superior a 10,0.

b. En una determinación de la **sensibilidad** analítica, el **kit de genotipado por PCR en tiempo real HLA-B27** demostró la capacidad de detectar de forma reproducible 1 o más equivalentes de genoma por reacción de PCR.

El límite inferior de detección no es inferior a 1,0 ng de ADN humano por tubo de amplificación, que corresponde a  $C_p \leq 32,0$  en el canal de detección IC. Cuando la cantidad de ADN es menor ( $C_p > 32,0$  en el canal de detección IC), el fabricante no garantiza el resultado correcto del kit.

Después de la reacción de amplificación para las muestras con una cantidad insuficiente de ADN (menos de 1,0 ng por tubo de amplificación), el resultado se define como no confiable.

c. Características diagnósticas

Número de muestras	N=150
Sensibilidad analítica (IC 95%)	100% (94,1-100%)
Especificidad analítica (IC 95%)	100% (95,9-100%)
Sensibilidad diagnóstica (IC 95%)	100% (92,9-100%)
Especificidad diagnóstica (IC	89% (81,2-94,4%)



Las especificaciones están garantizadas cuando la extracción de ADN se realiza con PREP-GS Genética **REF** P-023/4EU o PREP-RAPID Genetics **REF** Kits P-021/4EU

## 12. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Tabla 6. Solución de problemas

	Resultado	Posible causa	Solución
C+	-	Error de operación Inhibición de la PCR No cumplimiento de los requisitos de almacenamiento y manipulación	Repetir toda la prueba  Eliminar el lote actual
C-	+	Contaminación	Eliminar el lote actual Realice procedimientos de descontaminación
IC	Inválido	Inhibición de la PCR	Repetir toda la prueba Volver a muestrear

Si se enfrenta a cualquier problema no descrito, póngase en contacto con nuestro departamento de atención al cliente en relación con los problemas de calidad del kit:

Soporte técnico Correo electrónico: [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru), [www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru).

## 13. CONTROL DE CALIDAD

"DNA -Technology Research&Production", LLC declara que los productos mencionados anteriormente cumplen con la disposición de la Directiva del Consejo 98/79/CE para los productos sanitarios de diagnóstico *in vitro*. Los procedimientos de control de calidad realizados de acuerdo con la norma ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016:

- observación de la gestión de la calidad en la fabricación de productos IVDD;

- creación de valores para los clientes;
- mantenimiento de la mejor calidad de servicio y gestión de clientes.

Póngase en contacto con nuestro servicio de atención al cliente por problemas de calidad del **Kit de genotipado PCR en tiempo real HLA-B27:**

Soporte técnico Correo electrónico: [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru),  
[www.dna-technology.com](http://www.dna-technology.com)

**Fabricante:** "DNA-Technology, Research & Production" LLC

Rusia, 142281, Región de Moscú,

Protvino, calle Zheleznodorozhnaya 20,

Teléfono/fax: +7(495) 640.17.71

Correo electrónico: [info@dna-](mailto:info@dna-technology.com)

[technology.com](mailto:info@dna-technology.com)

<http://www.dna-technology.com>

**Vendedor:** "DNA-Technology" LLC

Rusia, 117587, Moscú

125g, Varshavskoe sh., bld. 6, planta 5, sala 14

Teléfono/fax: +7(495) 640.17.71

Correo electrónico: [mail@dna-technology.ru](mailto:mail@dna-technology.ru)

#### 14. GUIA DE LOS SÍMBOLOS

	Dispositivo de diagnóstico invitro		Fecha de fabricación
	Temperatura limite		Consulte las instrucciones de uso
	Suficiente para		Número de catálogo
	Uso por		Fabricante
	Código de lote		Mantengalejos de luz solar
	Precaución		Versión
	Control negativo		Control positivo



No estéril



No reutilizar

**REF**R1-H004-23/4INT, R1-H004-S3/4INT,  
R1-H004-N3/4INT**VER**

561.2018.12.27