



Instrucciones de uso

Coeliac ImmuneKit

Ref. IMG-420



Fabricado por:

HEALTH IN CODE, S.L

Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia, 46024, España
+34 963 212 340 - info@healthincode.com

healthincode.com

Código: HIC-PT-KIT 03-F-03 V.01

healthincode

Health in Code, S.L. 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.

Este producto está diseñado para su uso exclusivo en investigación. Health in Code, S.L. 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 Health in Code, S.L. 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. Health in Code, S.L. 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 Health in Code S.L. son sometidos a un riguroso control de calidad. El producto **Coeliac ImmuneKit** 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:

 +34 963 212 340

 tech.support@healthincode.com

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)

Versión 02	SEP 2023	Cambios en el contenido del documento
------------	----------	---------------------------------------

Versión 01	NOV 2022	Creación del documento
------------	----------	------------------------

índice

01	Información general	4
02	Uso previsto	6
03	Características técnicas	7
04	Advertencias y precauciones	8
05	Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	9
06	Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran	10
07	Protocolo de ensayo	11
07.1	Preparación de las reacciones de amplificación	11
07.2	Configuración del programa de la PCR a tiempo real	12
08	Análisis de los resultados	13
09	Troubleshooting	21
10	Limitaciones	22
10.1	Equipos	22
10.2	Reactivos	22
10.3	Estabilidad del Producto	22

01 Información general

La celiaquía es un trastorno inmunitario complejo con una fuerte influencia genética. En personas predispuestas genéticamente, la ingestión de gluten (proteína presente en trigo, centeno y cebada) provoca una respuesta inmune que ataca al intestino delgado causando daño a las vellosidades, inflamación del intestino e incapacidad para absorber nutrientes, dando lugar a una serie de síntomas entre los que se incluyen diarrea, dolor y distensión abdominales.

Los genes principales implicados en el desarrollo de la celiaquía pertenecen al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), localizado en 6p21. El MHC 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. En la celiaquía, los genes del MHC implicados en el reconocimiento del gluten, y en la presentación a células T CD4+, son los codificantes de los receptores HLA-DQ8, HLA-DQ2 (2.2 o 2.5) y HLA-DQ7.5. Este tipo de receptor se conforma de dos subunidades, α y β que constituyen la proteína heterodimérica DQ $\alpha\beta$, ambas subunidades son codificadas por dos genes diferentes, *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* respectivamente.

Alrededor del 90% de los pacientes con celiaquía presentan el heterodímero responsable de la respuesta inmunológica al gluten HLA-DQ2.5 (genotipo *HLA-DQA1*05* y *HLA-DQB1*02*), mientras que la mayoría de los pacientes restantes afectados presentan el heterodímero HLA-DQ8 (genotipo *HLA-DQA1*03* y *HLA-DQB1*03:02*). El heterodímero HLA-DQ7.5 (genotipo *HLA-DQA1*05* y *HLA-DQB1*03:01*) es el de menor riesgo genético y menos representado entre la población afectada. Además, hay un efecto de dosis en los genes *HLA-DQB1*02* y *HLA-DQB1*03*, por lo que informar de la carga genética (una o dos copias) es aconsejable.

Genética HLA			
Alelos <i>HLA-DQA1</i>	Alelos <i>HLA-DQB1</i>	Haplotipo HLA-DQ	Proteína DQ
*05	*02	DQ2.5	DQ2.5
*03	*03:02	DQ8	DQ8
*02	*02	DQ2.2	DQ2.2
*05	*03:01	DQ7.5	DQ7.5

Tabla 1. Alelos y haplotipos HLA-DQ que confieren riesgo a enfermedad celíaca, incluidas las proteínas que codifican

Se estima que la celiaquía, a nivel mundial, afecta a 1 de cada 100 personas, la mayoría de las cuales no están diagnosticadas y, por tanto, tienen riesgo de sufrir complicaciones de salud a largo plazo. La celiaquía puede desarrollarse a cualquier edad tras la ingesta de alimentos y medicamentos con gluten. Si no se trata, puede derivar en problemas de salud graves adicionales. En niños, la mala absorción también puede afectar al crecimiento y el desarrollo.

A medida que ha avanzado el conocimiento de esta enfermedad, el estudio del sistema HLA ha ido cobrando más relevancia como herramienta diagnóstica, hasta culminar con su incorporación en las nuevas recomendaciones diagnósticas para niños y adolescentes propuesta por la *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN), así como también en las guías de adultos.

Referencias

- > *Martínez-Ojinaga E, et al. 2018. HLA-DQ distribution and risk assessment of celiac disease in a Spanish center, Revista Española de Enfermedades Digestivas, 110(7), pp. 421-426. doi: 10.17235/reed.2018.5399/2017*
- > *Núñez, C. et al. 2018. Recommendations to report and interpret HLA genetic findings in coeliac disease, Revista Española de Enfermedades Digestivas, 110(7), pp. 458-461. doi: 10.17235/reed.2018.5269/2017*

02 Uso previsto

El kit **Coeliac ImmuneKit** emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes en un análisis cualitativo de PCR a tiempo real validado para detectar simultáneamente los genotipos más frecuentes asociados a una mayor susceptibilidad de desarrollar celiacía. Concretamente este ensayo permite detectar los alelos *HLA-DQA1*02*, *HLA-DQA1*03*, *HLA-DQA1*05*, *HLA-DQB1*03:01* y *HLA-DQB1*03:02*, así como la discriminación alélica entre el alelo *HLA-DQB1*02* y el resto de alelos *HLA-DQB1* (*DQB1*03*, *DQB1*04*, *DQB1*05* y *DQB1*06*) mediante PCR a tiempo real empleando sondas TaqMan™.

Este análisis genético permitirá al usuario detectar la presencia o ausencia de tales genotipos en cuatro reacciones de PCR a tiempo real multiplexadas, que incluyen la amplificación del gen de referencia *β-globina*, como control de la calidad y cantidad del ADN.

El kit **Coeliac ImmuneKit** estudia el genotipo en la línea germinal, por lo que el tipo óptimo de muestra requerido para este análisis es ADN genómico extraído a partir de una muestra de sangre periférica.

El kit **Coeliac ImmuneKit** es sólo para uso en investigación y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

03 Características técnicas

La validación del kit **Coeliac ImmuneKit** se ha llevado a cabo mediante el análisis de muestras ya diagnosticadas, genotipadas previamente con una técnica diferente, así como mediante el uso de vectores sintéticos (GenScript) que contienen las secuencias de interés. Estos vectores se proporcionan como controles positivos, para garantizar la configuración y el funcionamiento correcto del sistema de PCR.

Especificaciones técnicas:

- ◇ Tipo de muestra: ADN genómico procedente de sangre periférica
- ◇ Cantidad total de ADN necesario: 200 ng
- ◇ Límite de detección: 1 ng ADN

El kit **Coeliac ImmuneKit** es compatible con plataformas de PCR a tiempo real con canales de fluorescencia FAM™ y VIC™.

Coeliac ImmuneKit es sólo para uso en investigación y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular

04 Advertencias y precauciones

- ◇ Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
- ◇ No pipetear con la boca.
- ◇ No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
- ◇ Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
- ◇ 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.
- ◇ 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.
- ◇ Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
- ◇ 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.
- ◇ Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
- ◇ 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.
- ◇ El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por Health in Code, S.L.
- ◇ El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por Health in Code, S.L. por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.

05

Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 48 reacciones de PCR a tiempo real para cada uno de los premásters analizados en este ensayo. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- **Coeliac Master Mix I:** Master Mix específico de PCR que contiene los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM™ y VIC™) que permiten la detección simultánea de los alelos *HLA-DQA1*05* y el gen endógeno *β-globina*, respectivamente, siendo este último usado como control endógeno de la PCR.
- **Coeliac Master Mix II:** Master Mix específico de PCR que contiene los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM™ y VIC™) que permiten la discriminación simultánea entre el alelo *HLA-DQB1*02* y el resto de los alelos *HLA-DQB1*, respectivamente.
- **Coeliac Master Mix III:** Master Mix específico de PCR que contiene los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM™ y VIC™) que permiten la discriminación simultánea entre el alelo *HLA-DQB1*03:02* y el alelo *HLA-DQA1*03*, respectivamente.
- **Coeliac Master Mix IV:** Master Mix específico contiene los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM™ y VIC™) que permiten la discriminación simultánea entre el alelo *HLA-DQA1*02* y el alelo *HLA-DQB1*03:01*, respectivamente.
- **General Master Mix:** Master Mix de PCR con los nucleótidos, MgCl₂, enzima y *buffer* necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real.
- **Control Positivo:** ADN sintético que contiene las secuencias de las regiones amplificadas coincidentes con todos los alelos incluidos en el kit

Reactivos	Color del soporte	Cantidad	Conservación
Master Mix I Coeliac	Disco rojo	2 x 180 µl	-20°C
Master Mix II Coeliac	Disco amarillo	2 x 180 µl	-20°C
Master Mix III Coeliac	Disco morado	2 x 180 µl	-20°C
Master Mix IV Coeliac	Disco verde	2 x 180 µl	-20°C
General Master Mix	Disco blanco	4 x 600 µl	-20°C *
Control Positivo	Tapa negra	2 x 100 µl	-20°C

Tabla 2. Componentes del kit Coeliac ImmuneKit IMG-420

(*) **General Master Mix:** Se recomienda congelarlo antes de su primer uso, protegido de la luz, y almacenarlo entre 2-8 °C después de su primer uso.

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real (canales FAM y VIC)
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL y 200 µL
- *Vortex*
- Centrifuga

Reactivos:

- Agua libre de nucleasas

Materiales:

- Placas ópticas de 96 pocillos o tubos ópticos de 0.2mL compatibles con el termociclador de PCR a tiempo real
- Film óptico para placa de 96 pocillos o tapas ópticas para tubos de 0.2 mL compatibles
- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL y 200 µL)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Guantes de látex sin polvo

Kits complementarios

Para una detección sensible y específica de otros alelos de HLA con diferentes dianas clínicas, Health in Code, S.L. ha desarrollado **Imegen® HLA-B57:01** (ref. IMG-306) e **Imegen® HLA-B27** (ref. IMG-289).

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de las reacciones de amplificación

- 01 Descongelar todos los reactivos del kit y el ADN de las muestras.
- 02 Agitar cada uno de los reactivos en vórtex y mantener en frío.
- 03 Para llevar a cabo el análisis será necesario preparar cuatro mixes de PCR, añadiendo en tubos de 1,5 mL los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad por reacción			
	Coeliac Master Mix I	Coeliac Master Mix II	Coeliac Master Mix III	Coeliac Master Mix IV
Coeliac Master Mix I	7.5 µL	-	-	-
Coeliac Master Mix II	-	7.5 µL	-	-
Coeliac Master Mix III	-	-	7.5 µL	-
Coeliac Master Mix IV	-	-	-	7.5 µL
General Master Mix	12.5 µL	12.5 µL	12.5 µL	12.5 µL

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.

- 04 Agitar en vórtex y dar spin a ambos mixes de PCR y dispensar 20 µL en los correspondientes pocillos del material fungible óptico.
- 05 Una vez dispensados los mixes de PCR, añadir a los pocillos correspondientes:
 - ◇ 5 µL de las muestras de ADN genómico (10 ng/µL).
 - ◇ 5 µL del control positivo.
 - ◇ 5 µL 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.

- 06 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.

07.2 | Configuración del programa de PCR a tiempo real

➤ Fluróforos de las sondas TaqMan®

Master Mix	Sonda de hidrólisis	Receptor	Genotipado	Quencher
Coeliac I	DQA1*05	FAM™	Alelo <i>HLA-DQA1*05</i>	MGB
	β -Globina	VIC™	β -Globina	
Coeliac II	DQB1*02	FAM™	Alelo <i>HLA-DQB1*02</i>	
	DQB1	VIC™	Alelo <i>HLA-DQB1</i> (excepto <i>HLA-DQB1*02</i>)	
Coeliac III	DQB1*03:02	FAM™	Alelo <i>HLA-DQB1*03:02</i>	
	DQA1*03	VIC™	Alelo <i>HLA-DQA1*03</i>	
Coeliac IV	DQA1*02	FAM™	Alelo <i>HLA-DQA1*02</i>	
	DQB1*03:01	VIC™	Alelo <i>HLA-DQB1*03:01</i>	

Tabla 3. Información de las sondas de hidrólisis.

➤ 7500 Fast y StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems)

- ◇ Tipo de experimento: Quantitation- Standard curve
- ◇ Velocidad de rampa: standard
- ◇ Volumen de reacción: 25 μ L
- ◇ Referencia basal ROX™: incluida
- ◇ Establecer un Cycle threshold (Ct) en 0,1 para el análisis de resultados

Campos	Etapa 1 Activación enzimática		Etapa 2 PCR
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	40 ciclos	
		Desnaturalización	Anillamiento / Extensión
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tiempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto*

Tabla 4. Programa de PCR óptimo para los termocicladores 7500 FAST y StepOne Plus real-time PCR systems (Applied Biosystems)

(*). Detección de la fluorescencia

08 Análisis de resultados

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

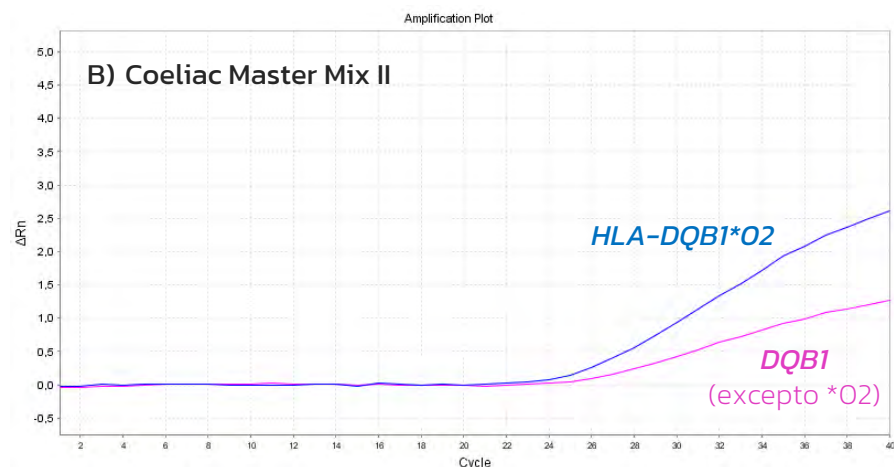
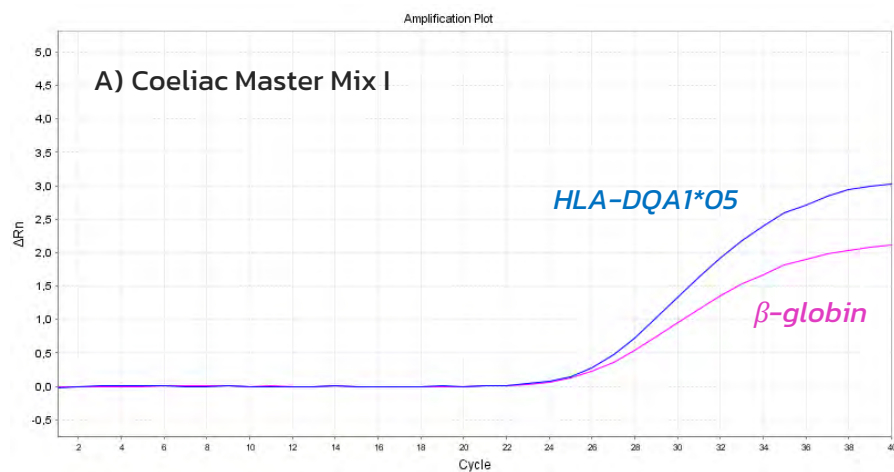
▾ CONTROLES NEGATIVOS

- ➔ Comprobar la ausencia de amplificación en los **controles negativos (NTC)**. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el análisis para descartar que se haya producido una contaminación accidental.

▾ CONTROL POSITIVO

- ➔ Confirmar que el **control positivo** amplifica todos los alelos esperados con los cuatro mixes de reacción. Si no se detecta amplificación en el control positivo, revise la sección 9 de este documento.

A continuación, se muestran los resultados esperados del control positivo para todos los mixes del kit:



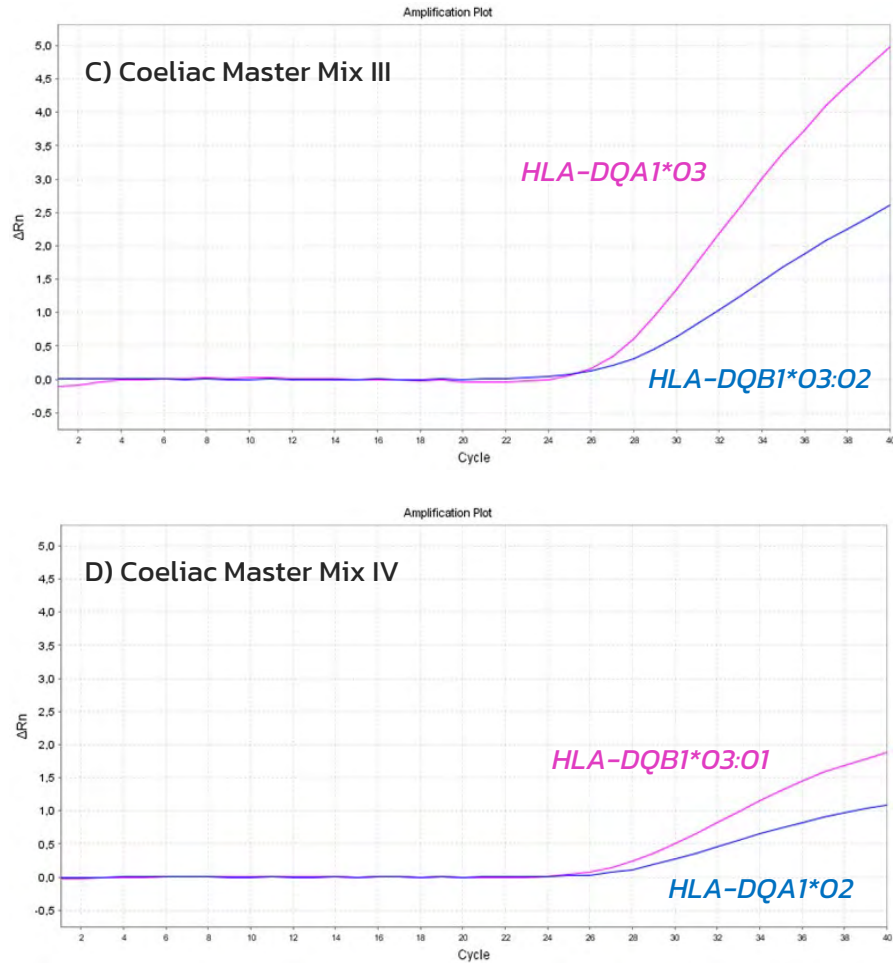


Figura 1. Resultados esperados para el control positivo con los 4 mixes incluidos en el kit. A) Coeliac Master Mix I: HLA-DQA1*05 (FAM), β -globina (VIC). B) Coeliac Master Mix II: HLA-DQB1*02 (FAM), resto de alelos HLA-DQB1 (VIC). C) Coeliac Master Mix III: HLA-DQB1*03:02 (FAM) y HLA-DQA1*03 (VIC). D) Coeliac Master Mix IV: HLA-DQA1*02 (FAM), HLA-DQB1*03:01 (VIC)

A continuación, se muestran los posibles resultados obtenidos con el kit **Coeliac ImmuneKit**:

↘ MUESTRAS DE ADN GENÓMICO

➤ Coeliac Master Mix I

Este sistema de PCR detecta la presencia del alelo *HLA-DQA1*05* y el gen endógeno *β-globina*. Para un correcto análisis de todos los resultados obtenidos con el kit, en primer lugar, se debe confirmar la detección del gen endógeno *β-globina* en todas las muestras de ADN. El gen *β-globina* es un gen ubicuo, por lo que su presencia informa al usuario sobre la buena calidad e integridad de la muestra de ADN.

Los posibles resultados obtenidos se muestran a continuación:

◇ Presencia del alelo *HLA-DQA1*05* y el gen endógeno *β-globina* (VIC):

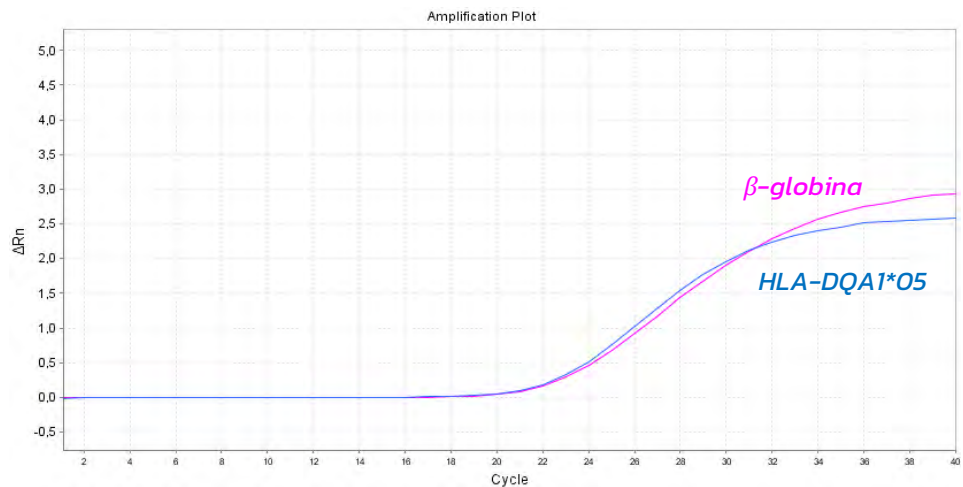


Figura 2. Resultados esperados para una muestra que presenta el alelo *HLA-DQA1*05* (FAM) y *β-globina* (VIC). Se observa señal de amplificación en todos los canales.

◇ Ausencia del alelo *HLA-DQA1*05* y presencia de *β-globina* (VIC):

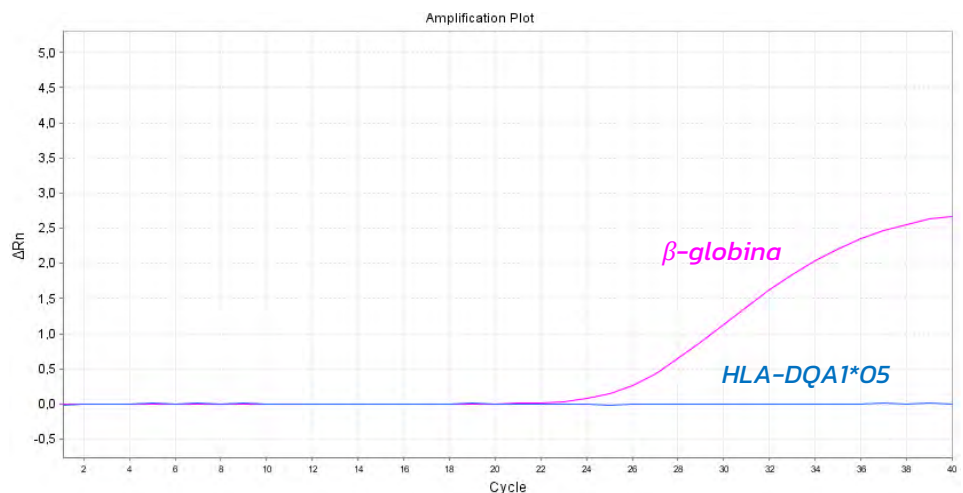


Figura 3. Resultados esperados para una muestra de ADN que no presenta el alelo *HLA-DQA1*05*. Sólo se detectará el gen endógeno *β-globina* (VIC).

➤ Coeliac Master Mix II

Este sistema de PCR detecta el genotipo del gen *HLA-DQB1* y discrimina entre *HLA-DQB1*02* y el resto de alelos *HLA-DQB1*.

Los posibles resultados obtenidos se muestran a continuación:

- ◇ Genotipo homocigoto *HLA-DQB1*02* / *HLA-DQB1*02* (2 copias del alelo *HLA-DQB1*02*):

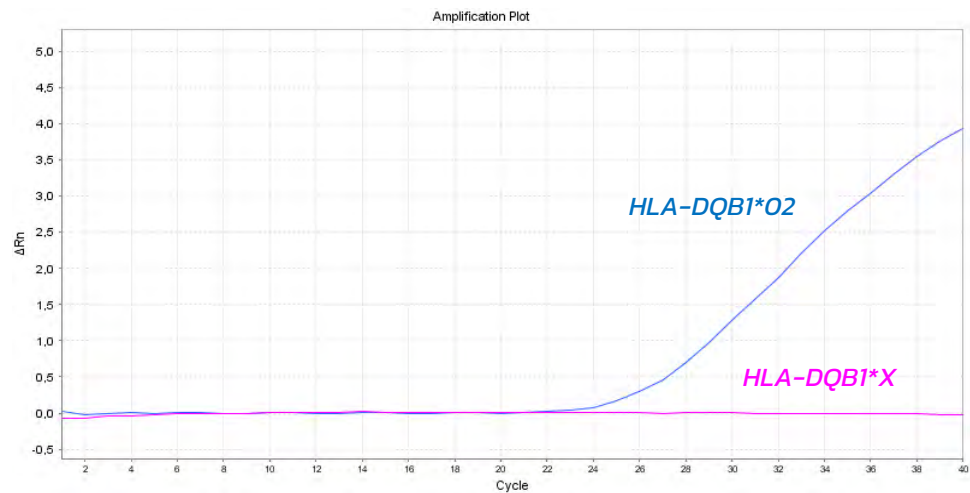


Figura 4. Resultado esperado para una muestra homocigota para el alelo *HLA-DQB1*02* (FAM). Sólo se detecta amplificación en el canal FAM.

- ◇ Genotipo heterocigoto *HLA-DQB1*02* / *HLA-DQB1*X* (1 copia del alelo *HLA-DQB1*02*):

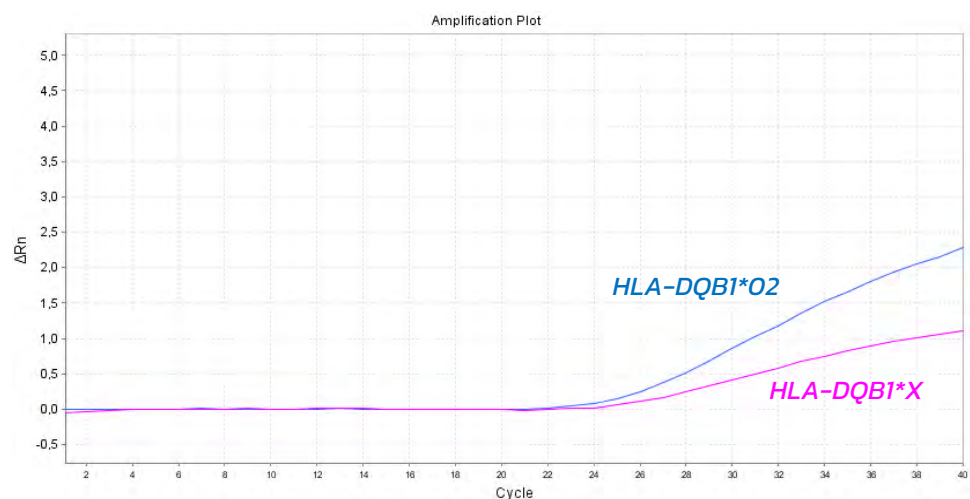


Figura 5. Resultado esperado para una muestra heterocigota para *HLA-DQB1*, en la que uno de los alelos es *HLA-DQB1*02* (FAM). Se detecta amplificación en ambos canales, FAM y VIC. Nota: "X" hace referencia a cualquier alelo diferente a *HLA-DQB1*02* (VIC).

➤ Coeliac Master Mix III

Este sistema de PCR detecta el genotipo del gen *HLA-DQB1*03:02* y *HLA-DQA1*03*.

Los posibles resultados obtenidos se muestran a continuación:

◇ Presencia de los alelos *HLA-DQB1*03:02* y de *HLA-DQA1*03*:

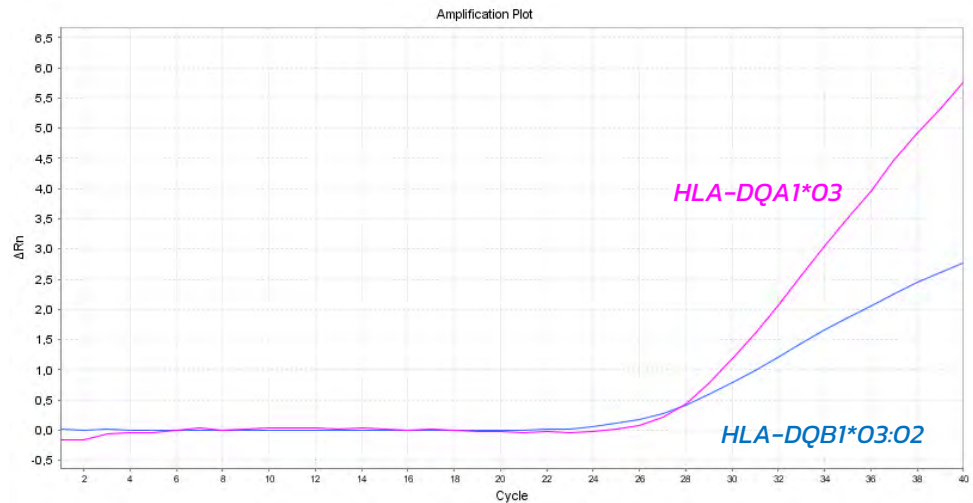


Figura 6. Resultado esperado para una muestra positiva para DQ8. Presencia de los alelos *HLA-DQB1*03:02* (FAM) y *HLA-DQA1:03* (VIC). Se detecta amplificación en ambos canales, FAM y VIC.

➔ Coeliac Master Mix IV

Este sistema de PCR detecta el genotipo del gen *HLA-DQA1*02* y *HLA-DQB1*03:01*. Los posibles resultados obtenidos se muestran a continuación:

◇ Presencia de los alelos *HLA-DQA1*02* y de *HLA-DQB1*03:01*:

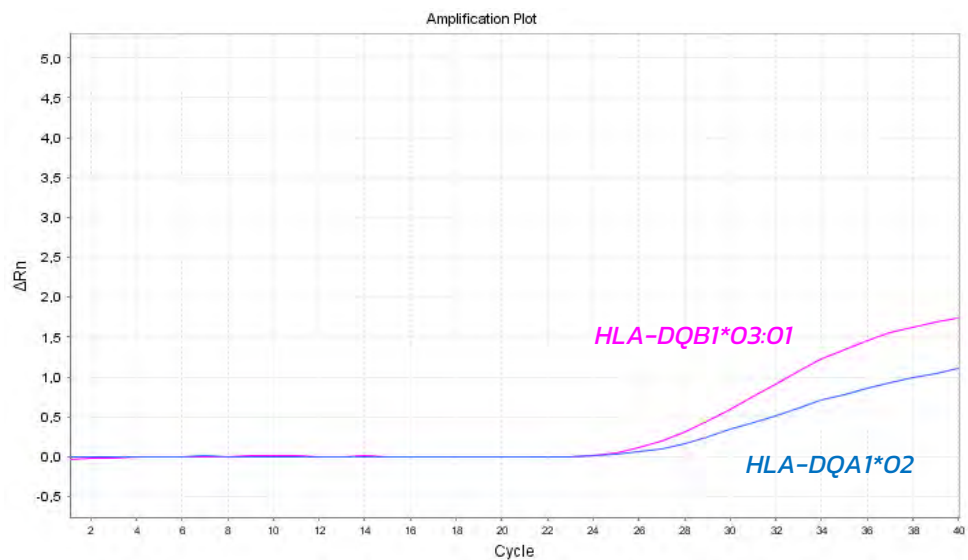


Figura 7. Resultado esperado para una muestra que presenta los alelos *HLA-DQA1*02* (FAM) y *HLA-DQB1*03:01* (VIC). Se detecta amplificación en ambos canales, FAM y VIC.

◇ Presencia del alelo *HLA-DQA1*02* y ausencia de *HLA-DQB1*03:01*:

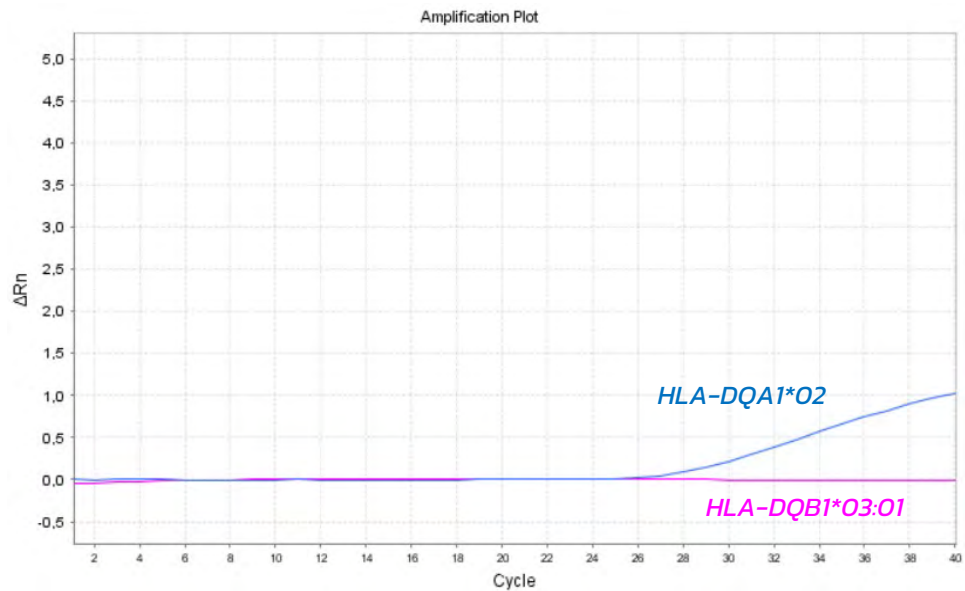


Figura 8. Resultado esperado para una muestra homocigota para el alelo *HLA-DQA1*02* (FAM). Sólo se detecta amplificación en el canal FAM.

◇ Presencia del alelo *HLA-DQB1*03:01* y ausencia de *HLA-DQA1*02*:

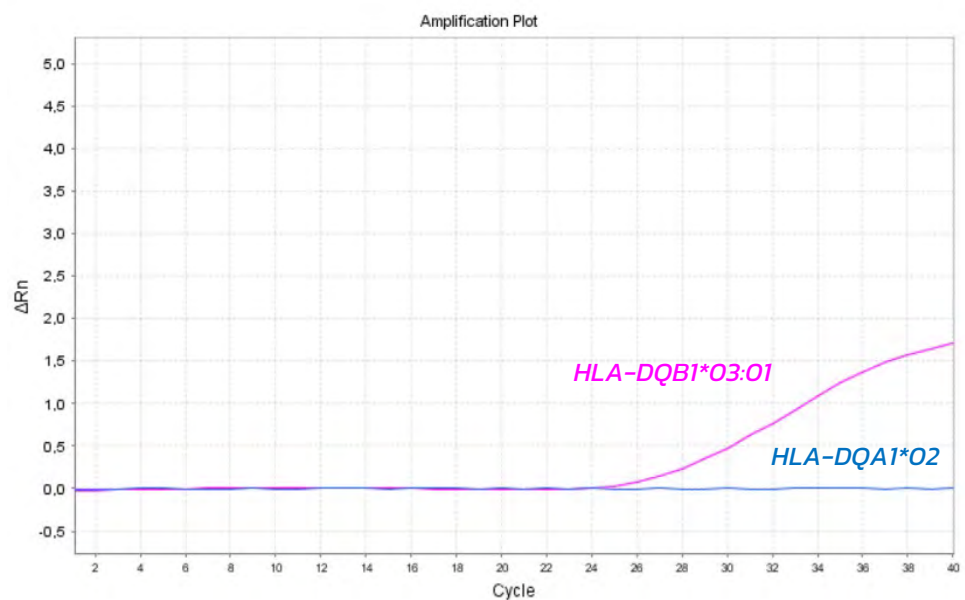


Figura 9. Resultado esperado para una muestra homocigota para el alelo *HLA-DQB1*03:01* (VIC). Sólo se detecta amplificación en el canal VIC.

+ Recomendaciones para la interpretación de los resultados en enfermedad celíaca

Se recomienda establecer un *cut-off* basándose en el resultado obtenido para el gen endógeno, *β-globina*. Los resultados obtenidos para cada alelo se considerarán positivos o negativos en función del resultado que se obtenga de la *β-globina*:

- ↘ POSITIVO Ct DQ < (Ct *β-globina* +6 Ct)
- ↘ NEGATIVO Ct DQ > (Ct *β-globina* +6 Ct)

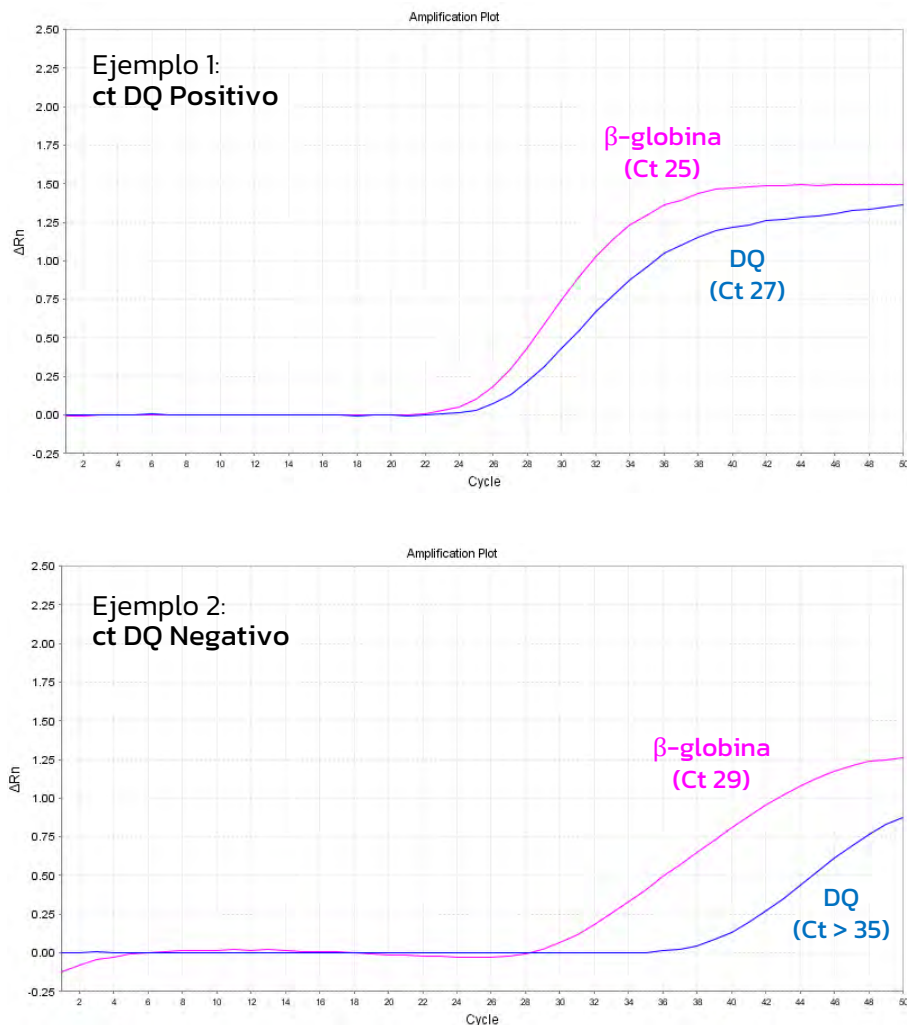


Figura 10. Ejemplo de interpretación de un ensayo de celiaquía para considerar positiva (Ejemplo 1) o negativa (Ejemplo 2) una muestra. Cycler threshold en 0,1.

El riesgo a presentar EC varía en función del genotipo HLA-DQ presente. En base a ello, se puede indicar el grado de riesgo que presentará cada individuo.

Haplotipos	DQ2		DQ7.5	DQ8	Otros
	DQ2.5	DQ2.2			
	HLA-DQB1*02 HLA-DQA1*05	HLA-DQB1*02 HLA-DQA1*02	HLA-DQB1*03:01 HLA-DQA1*05	HLA-DQB1*03:02 HLA-DQA1*03	
DQ2.5	Muy alto	Muy alto	Alto	Alto	Alto
DQ2.2		Moderado	Alto	Moderado	Moderado
DQ7.5			Bajo	Moderado	Bajo
DQ8				Alto	Moderado
Otros					Sin riesgo

Tabla 5. Riesgos atribuidos a las distintas combinaciones de haplotipos.

+ Recomendaciones para la interpretación de informes genéticos en enfermedad celíaca

Un informe genético debe incluir la información recogida en los siguientes puntos:

- ◇ Indicar si el individuo presenta el heterodímero HLA-DQ2, en referencia a DQ2.5 (presencia de los alelos *HLA-DQA1*05* y *HLA-DQB1*02*), y/o HLA-DQ8 (presencia de los alelos *HLA-DQA1*03* y *HLA-DQB1*03:02*) y/o HLA-DQ7.5 (presencia de los alelos *HLA-DQA1*05* y *HLA-DQB1*03:01*).
- ◇ En caso de que el individuo no presente HLA-DQ2 (DQ2.5) ni DQ8 ni DQ7.5, se debe indicar si presenta alguno de los alelos que codifican DQ2.5: *HLA-DQA1*05* o *HLA-DQB1*02*.

09 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 y la razón más probable que causa dicho resultado:

Muestra	Alelos HLA	β -globina	Causa
Control positivo	+	+	Resultado esperado
	-	-	Fallo de amplificación en la PCR ¹
	+	-	
	-	+	
Muestra	+	+	Resultado esperado
	-	+	Fallo de amplificación de la muestra ²
	+	-	
	-	-	
Control Negativo de PCR	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con ADN humano ³

Tabla 6. Interpretación de los posibles resultados obtenidos mediante el uso del kit Coeliac ImmuneKit IMG-420

(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.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

Coeliac ImmuneKit ha sido validado usando las siguientes plataformas de PCR a tiempo real:

- + *7500 FAST Real-Time PCR System* (Applied Biosystems)
- + *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems)

Técnicamente, este kit es compatible con cualquier sistema de PCR a tiempo real capaz de detectar la fluorescencia emitida por los fluoróforos FAM™ y VIC™.

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

10.2 | Reactivos

Coeliac ImmuneKit se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual (Equipos, reactivos 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.

Contacte con nuestro Departamento Técnico para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos:

✉ tech.support@healthincode.com

☎ +34 963 212 340

healthincode



Conoce todos nuestros
kits de diagnóstico

