



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2019 - Año de la Exportación

Disposición

Número: DI-2019-8369-APN-ANMAT#MSYDS

CIUDAD DE BUENOS AIRES

Jueves 10 de Octubre de 2019

Referencia: 1-47-3110-1713-17-4

VISTO el expediente N° 1-47-3110-1713-17-4 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma HEMOMEDICA S.R.L. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos de los Productos para diagnóstico de uso in vitro denominados: 1) PRECISE TYPE BEADCHIP TEST - HEA; 2) PRECISE TYPE BEADCHIP KIT - HEA; 3) ARRAY IMAGIN SYSTEM (AIS) - AIS 400 C; 4) ARRAY IMAGIN SYSTEM (AIS) - AIS 400 D; 5) HPA BEADCHIP™ KIT; 6) RHD BEADCHIP™ KIT; 7) RhCE BEADCHIP™ KIT.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización y que se deberá comunicar por nota al Servicio de Productos para Diagnóstico la primera importación de los productos de referencia con el objetivo de efectuar la evaluación del primer lote en el país.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM de los productos médicos objetos de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE

MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de los productos médicos para diagnóstico de uso in vitro: 1) PRECISE TYPE BEADCHIP TEST - HEA; 2) PRECISE TYPE BEADCHIP KIT - HEA; 3) ARRAY IMAGIN SYSTEM (AIS) – AIS 400 C; 4) ARRAY IMAGIN SYSTEM (AIS) – AIS 400 D; 5) HPA BEADCHIP™ KIT; 6) RHD BEADCHIP™ KIT; 7) RhCE BEADCHIP™ KIT, de acuerdo con lo solicitado por la firma HEMOMEDICA S.R.L, con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda "Autorizado por la ANMAT PM-1049-58", con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTICULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERISTICOS

Nombre comercial: 1) PRECISE TYPE BEADCHIP TEST - HEA; 2) PRECISE TYPE BEADCHIP KIT - HEA; 3) ARRAY IMAGIN SYSTEM (AIS) – AIS 400 C; 4) ARRAY IMAGIN SYSTEM (AIS) – AIS 400 D; 5) HPA BEADCHIP™ KIT; 6) RHD BEADCHIP™ KIT; 7) RhCE BEADCHIP™ KIT.

Indicación de uso: ENSAYOS CUALITATIVOS DISEÑADOS PARA LA DETERMINACIÓN MOLECULAR DE DIFERENTES ANTÍGENOS EN HEMATÍES, ASOCIADOS A VARIANTES FENOTÍPICAS CLINICAMENTE SIGNIFICATIVAS.

Forma de presentación: envases por 96 determinaciones, conteniendo:

Mezcla para PCR HEA 1.2 (2 x 900 µl), Clean-up Reagent (1 x 330 µl), Lambda Exonuclease (1 x 330 µl), eMAP Elongation Mix (2 x 600 µl), HotStarTaq DNA Polymerase (1 x 155 µl), Control negativo (1 x 1000 µl), 12 bandejas x 8 matrices de BeadChip o 1 bandejas x 96 matrices de BeadChip; 2) Envases conteniendo: BeadCheck HEA Ref-pA y BeadCheck HEA Ref-pB; 3) No aplica; 4) No aplica; 5) Envases por 96 determinaciones, conteniendo: Mezcla para PCR HPA eMAP (2 x 900 µl), Clean-up Reagent (1 x 330 µl), Lambda Exonuclease (1 x 330 µl), eMAP Elongation Mix (2 x 600 µl), HotStarTaq DNA Polymerase (1 x 155 µl), Control negativo (1 x 1000 µl), 12 bandejas x 8 matrices de BeadChip; 6) Envases por 48 determinaciones, conteniendo: Mezcla para PCR RHD eMAP (1 x 900 µl), HotStarTaq DNA Polymerase (1 x 155 µl), Clean-up Reagent (1 x 330 µl), Lambda Exonuclease (1 x 330 µl), eMAP Elongation Mix (1 x 600 µl), Control negativo (1 x 1000 µl), 6 bandejas x 8 matrices de BeadChip; 7) Envases por 48 determinaciones, conteniendo: Mezcla para PCR RHCE eMAP (1 x 900 µl), HotStarTaq

DNA Polymerase (1 x 155 µl), Clean-up Reagent (1 x 330 µl), Lambda Exonuclease (1 x 330 µl), eMAP Elongation Mix (1 x 600 µl), Control negativo (1 x 1000 µl), 6 bandejas x 8 matrices de BeadChip.

Período de vida útil y condición de conservación: 1) y 2) VEINTICINCO (25) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre -20 y 80 °C; 3) No aplica; 4) No aplica; 5) DIECIOCHO (18) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre -20 y -80 °C; 6) y 7) NUEVE (9) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre -20 y -80 °C.

Nombre y dirección del fabricante: 1) a 4) IMMUCOR Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Straße 32. 63303 Dreieich. (ALEMANIA); 5) a 7) BIOARRAY SOLUTIONS LIMITED, 35 Technology Dr Ste 100. Warren, NJ 07059. (USA).

Condición de Venta/Categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Expediente N° 1-47-3110-1713-17-4

Digitally signed by BELLOSO Waldo Horacio
Date: 2019.10.10 10:24:03 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Waldo HORACIO BELLOSO
SubAdministrador
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología
Médica

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRÓNICA - GDE
Date: 2019.10.10 10:24:08 -03:00



Proyecto de Rótulo

PreciseType™
PreciseType BeadChip™ Test | HEA **IVD**
Reagents

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> CONT (2) HEA 1.2 PCR Mix (1) HotStarTaq DNA Polymerase® (1) Negative Control (1) Clean-up Reagent (1) Lambda Exonuclease (2) eMAP® Elongation Mix </div>	REF 800-20202-08 800-20202-96 800-20201 LOT 99-999 YYYY-MM-DD
--	--

P/N 190-20218 Rev. C

96
 -80°C -20°C

HEA 96-BeadChip™ Carrier

CONT	(1) 1 x 96-BeadChip Carrier
REF	830-00055
LOT	99-999

P/N 190-00214 Rev. C

96
 2°C 8°C
 YYYY-MM-DD

BioArray Solutions, Ltd

HEA 8-BeadChip™ Carrier

CONT	(1) 1 x 8-BeadChip Carrier
REF	830-00056
LOT	99-999

P/N 190-00213 Rev. D

8
 2°C 8°C
 YYYY-MM-DD

BioArray Solutions, Ltd

HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
 HEMOMEDICA S.R.L.
 PAOLA ZUCCHINI
 Directora Técnica
 Página 1 de 174



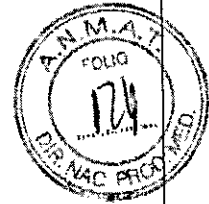
Proyecto de Rótulo

IVD	
PreciseType HEA BeadCheck® Kit	
CONT (1) BeadCheck HEA Ref-pA (1) BeadCheck HEA Ref-pB (1)	REF 800-20236 LOT XX-XXX YYYY-MM-DD
12	-20°C -80°C
P/N 190-20230 Rev. A	

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. FEINOSO

HEMOMEDICA S.R.L.
PAUL A. ZUCCHINI
Directora Técnica
M N 12 855

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT



ROTULOS INTERNOS Y EXTERNOS DE ORIGEN DEL Kit RHD BeadChip

RHD BEADCHIP™ KIT

CONT

(6) 1 x 8 BeadChip™ Carrier

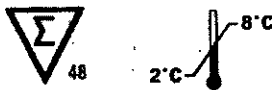
(1)

REF 800-10220-48
800-10275

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD

P/N 190-10238 Rev. B



RHD BEADCHIP™ KIT

CONT

(1) RHD PCR Mix
(1) HotStarTaq DNA Polymerase®
(1) Negative Control
(1) Clean-up Reagent
(1) Lambda Exonuclease
(1) eMAP® Elongation Mix

REF 800-10220-48
800-10274

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD

P/N 190-10239 Rev. B



RHD 8-BeadChip™ Carrier

CONT (1) 1 x 8-BeadChip™ Carriers

REF 830-00059

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

P/N 190-00300 Rev. B

Clean-up Reagent
330 µL

REF 800-00191

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

eMAP® Elongation Mix
600 µL

REF 800-00193

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

Lambda Exonuclease
330 µL

REF 800-00195

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

RHD PCR Mix
800 µL

REF 800-00221

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD

Negative Control
1 mL

REF 800-00257

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD

HotStarTaq DNA Polymerase®
155 µL

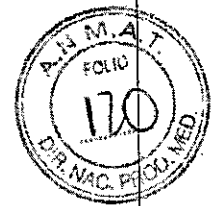
REF 800-10242

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REIMOSO

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULAZZICCHINI
IF-2019/78136523-APN-DNPM#ANMAT



RHCE BeadChip™ Kit

ROTULOS INTERNOS Y
EXTERNOS DE ORIGEN DEL
Kit RHCE BeadChip

CONT

(6) 1 x 8 BeadChip™ Carrier

(1) →

REF 800-10206-48
800-10281

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD

P/N 190-10303 Rev. B



RHCE BeadChip™ Kit

CONT

(1) RHCE eMAP™ PCR MIX
(1) HotStarTaq DNA Polymerase™
(2) Negative Control
(3) Clean-up Reagent
(3) Lambda Exonuclease
(1) eMAP™ Elongation Mix

REF 800-10206-48
800-10280

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD

P/N 190-10304 Rev. B



RHCE 8-BeadChip™ Carrier

CONT (1) 1 x 8-BeadChip™ Carrier

REF 830-00057

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD



BioArray Solutions Ltd.

P/N 190-0035 Rev. B

eMAP™ Elongation Mix

600 µL

REF 800-00193

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

HotStarTaq DNA Polymerase®

155 µL

REF 800-10242

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

Negative Control

1 mL

REF 800-00287

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

RHCE eMAP™ PCR Mix

800 µL

REF 800-00215

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

Lambda Exonuclease

330 µL

REF 800-00195

LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

Clean-up Reagent

330 µL

REF 800-00191

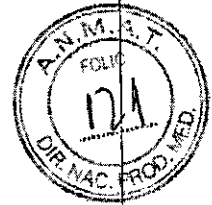
LOT XX-XXX

YYYY-MM-DD

BioArray Solutions Ltd.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
C.O.P. 130000

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
IF-2019-76136525-APN-DNPM#ANMAT
M.N. 12.858



ROTULOS INTERNOS Y EXTERNOS DE ORIGEN DEL Kit HPA BeadChip

HPA BeadChip™ Kit HUMAN PLATELET ANTIGEN TYPING

CONT
(12) 1 x 8 BeadChip™ Carrier
(1)

REF 800-10182
800-10226

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD



P/N 190-10194 Rev. C

HPA BeadChip™ Kit HUMAN PLATELET ANTIGEN TYPING

CONT
(2) HPA eMAP™ PCR Mix
(1) HotStarTaq DNA Polymerase™
(1) Negative Control
(1) Clean-up Reagent
(1) Lambda Exonuclease
(2) Elongation Mix

REF 800-10182
800-10227

LOT XX-XXXX

YYYY-MM-DD



P/N 190-10195 Rev. C

HPA 8-BeadChip™ Carrier

CONT (1) 1 x 8-BeadChip™ Carrier
REF 830-00052
LOT XX-XXXX
YYYY-MM-DD



BioArray Solutions Ltd.

P/N 190-00195 Rev. E

Clean-up Reagent
330 µL
REF 800-00191
LOT XX-XXX
YYYY-MM-DD
BioArray Solutions Ltd.

eMAP™ Elongation Mix
600 µL
REF 800-00193
LOT XX-XXX
YYYY-MM-DD
BioArray Solutions Ltd.

Negative Control
1 mL
REF 900-00287
LOT XX-XXXX
YYYY-MM-DD
BioArray Solutions Ltd.

Lambda Exonuclease
330 µL
REF 800-00195
LOT XX-XXX
YYYY-MM-DD
BioArray Solutions Ltd.

HPA eMAP™ PCR Mix
900 µL
REF 800-00186
LOT XX-XXXX
YYYY-MM-DD
BioArray Solutions Ltd.

HotStarTaq DNA Polymerase®
155 µL
REF 800-10242
LOT XX-XXX
YYYY-MM-DD
BioArray Solutions Ltd.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Directora Comercial



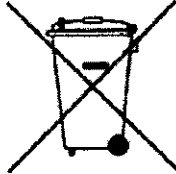


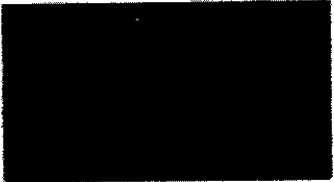

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
M/N 12.855


IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT




Proyecto de Rótulo

AIS 400D

 <p>BioArray Solutions, Ltd. 35 Technology Drive Warren, NJ 07059 USA</p>	<table border="1" style="margin: 0 auto;"><tr><td style="padding: 2px;">EC</td><td style="padding: 2px;">REP</td></tr></table> <p>Immucor Medizinische Diagnostik GmbH Adam-Opel-Strasse 26 A 63322 Rodermark, Germany</p>	EC	REP	
EC	REP			
	<table border="1" style="padding: 2px;"><tr><td style="padding: 2px;">REF</td><td style="padding: 2px;">790-20016</td></tr></table>	REF	790-20016	
REF	790-20016			
	 <table border="1" style="padding: 2px;"><tr><td style="padding: 2px;">IVD</td></tr></table>	IVD	 	
IVD				
	P/N 190-20408 Rev. A			

	YYYY-MM-DD	P/N 190-00260 Rev. C
<table border="1" style="padding: 2px;"><tr><td style="padding: 2px;">SN</td></tr></table>	SN	
SN		


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO


HEMOMEDICA S.R.L. 2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
PAULO ALICIANO
Diretor Técnico
M.N. 12.856



Proyecto de Rótulo

AIS 400C

<p>BioArray Solutions, Ltd 35 Technology Dr. Warren, NJ USA 07059</p>	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>EC</td><td>REP</td></tr></table> <p>Immucor Medizinische Diagnostik GmbH Adam-Opel-Strasse 26 A 63322 Rodermark, Germany</p>	EC	REP	
EC	REP			
	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>REF</td></tr></table> 790-20006	REF		
REF				
	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>CE</td></tr></table> <table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>IVD</td></tr></table>	CE	IVD	
CE				
IVD				
		<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>SN</td></tr></table>	SN	
SN				

P/N 190-20183 Rev A

	YYYY-MM-DD		
<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>SN</td></tr></table>	SN	XXXXXX	P/N 190-00260 Rev. C
SN			

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
M.N. 12.855

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT



SOBREROTULO

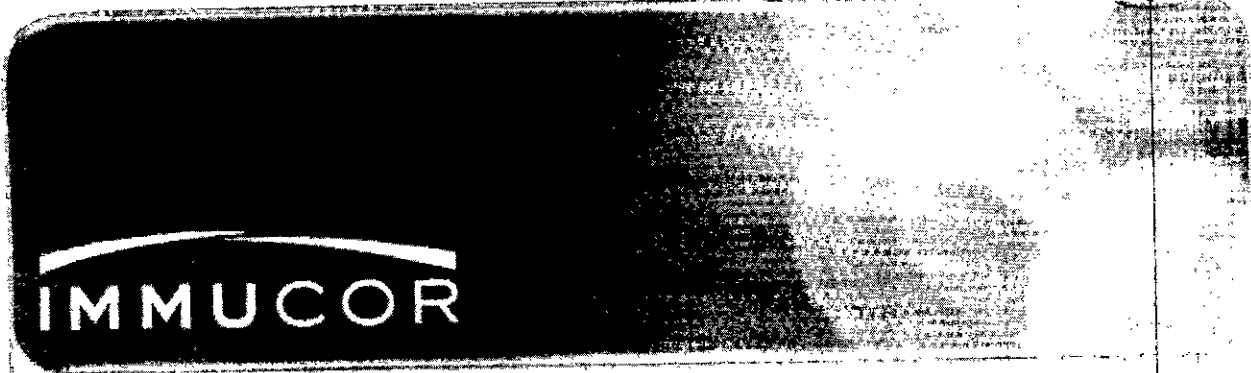
HemoMedica

Importado por:
Hemomedica S.R.L.
California 2082, Piso 2, Of 217, CABA
Argentina
Autorizado por ANMAT, N° de Certificado
DT: Ana Paula Zucchini. M.N. 12855


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Sec. de C. de G. de P.


HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
M.N. 12.855

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

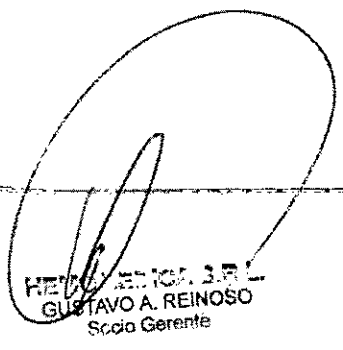


Análisis molecular PreciseType™ HEA HEA BeadChip

Inserto **IVD**

PreciseType | HEA

Transfuse | Transplant | Transform a **life**


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
M.N. 22.855
Página 9 de 174

G

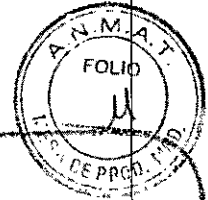
Índice

I. Introducción	3
A. Uso indicado	3
B. Resumen del análisis	3
C. Descripción del producto	4
II. Contenido del kit BeadChip, equipo e insumos requeridos	6
A. Contenido del kit PreciseType HEA	6
B. Equipo requerido	6
C. Equipo recomendado	6
D. Insumos requeridos	7
III. Definición de símbolos	8
IV. Advertencias y precauciones	9
V. Envío, almacenamiento y estabilidad	11
VI. Recolección y preparación de especímenes	11
VII. Procedimiento	12
A. Programas del termociclador Veriti Dx	12
B. Notas procedimentales	13
C. Preparación de la muestra maestra de PCR	14
D. Adición de muestras de ADN	16
E. Amplificación de PCR	18
F. Procesamiento posterior a PCR: Limpieza	19
G. Procesamiento posterior a PCR: Generación de secuencia diana monocatenaria	21
H. Elongación en matriz BeadChip	23
I. Adquisición de imágenes de BeadChip	25
VIII. Resultados previstos	26
A. Evaluación: control de calidad	26
B. Análisis de los resultados	27
C. Fenotipo y genotipo	28
IX. Limitaciones del procedimiento	29
X. Características específicas de desempeño	31
A. Estudio de exactitud	31
B. Acuerdo Clínico Global, Positivo y Negativo, según comparación con concordancia clínica y de serología, Sensibilidad y Especificidad según comparación con secuenciación de ADN	33
C. Acuerdo global del análisis HEA BeadChip con resolución post-discordante mediante serología y secuenciación	35
D. Repetibilidad y reproducibilidad	36
E. Sustancias interferentes	38
XI. Bibliografía	39
XII. Posibles mensajes de advertencia contenidos en el informe BASIS	40

©2016 Immucor, Inc. | 190-20210-LA Rev. C

Análisis molecular PreciseType HEA BeadChip | 190-20210-LA Rev. C | Octubre de 2016

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT



I. INTRODUCCIÓN

A. Uso indicado

El kit de análisis molecular PreciseType HEA BeadChip consiste en un análisis diagnóstico *in vitro* previsto para la determinación molecular de las variantes alélicas que predicen los fenotipos de antígenos eritrocitarios en los sistemas de grupos sanguíneos Rh (C [RH2], c [RH4], E [RH3], e [RH5], V [RH10], VS [RH20]); Kell (K [KEL1], k [KEL2], Kpa [KEL3], Kpb [KEL4], Jsa [KEL6], Jsb [KEL7]); Duffy (Fya [FY1], Fyb [FY2], GATA [FY-2], Fyx [FY2W]), Kidd (Jka [JK1], Jkb [JK2]), MNS (M [MNS1], N [MNS2], S [MNS3], s [MNS4], Uvar [MNS-3,5W], Uneg [MNS-3,-4,-5]), Lutheran (Lua [LU1], Lub [LU2]), Dombrock (Doa [DO1], Dob [DO2], Hy [DO4], Joa [DO5]), Landsteiner-Wiener (LWa [LW5], LWb [LW7]), Diego (Dia [DI1], Dib [DI2]), Colton (Coa [CO1], Cob [CO2]) y Scianna (Sc1[SC1], Sc2 [SC2]) en el ADN genómico humano. El análisis detecta, asimismo, la mutación HbS en el gen de la globina beta. Los resultados de la detección de esta mutación no se presentan con fines de diagnóstico de enfermedades drepanocíticas. Sin embargo, permiten identificar unidades adecuadas en pacientes selectos, por ejemplo, en aquellos que presentan enfermedades drepanocíticas y neonatos.

B. Resumen del análisis

El Análisis molecular PreciseType HEA BeadChip recurre a la tecnología del Análisis Multiplex de Polimorfismos por Elongación (eMAP™) a fin de identificar la presencia o ausencia de los alelos seleccionados que se asocian con un fenotipo dado. Luego de la amplificación multiplex de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y tras el procesamiento posterior a la PCR con el reactivo de limpieza y con la exonucleasa lambda, las cadenas simples de ADN se incuban en la matriz BeadChip, lo que les permite anillarse con las sondas específicas de cada grupo sanguíneo. La concordancia exacta entre el extremo 3' de la sonda y el ADN anillado produce la subsiguiente reacción de elongación en la que la sonda se extenderá mediante la incorporación de moléculas de dNTP marcadas por fluorescencia. De no haber concordancia exacta, no ocurrirá la elongación. Los productos de la elongación de los alelos A y B se detectan en simultáneo mediante la imagenología de la totalidad de la matriz.

En este método, cada sonda se une con un enlace covalente a un tipo de microesfera detectable mediante método espectroscópico. Una genoteca de tipos de microesferas individuales contiene todas las sondas de interés. La genoteca se inmoviliza en la matriz BeadChip, lo que permite la detección simultánea de los polimorfismos de interés.

La lectura de BeadChips se realiza con el sistema BioArray Array Imaging System™ (AIS™ 400) y se recurre al software BioArray Solutions Information System (BASIS™) para la interpretación, el análisis y la elaboración de informes de los resultados del análisis. El sistema AIS captura la señal fluorescente de las microesferas individuales en una imagen de la totalidad de la matriz a fin de determinar la identidad de la microesfera según su color y su posición en tal matriz. También detecta la intensidad promedio de la señal, el coeficiente de varianza y la desviación estándar de las intensidades, al igual que la cantidad de microesferas que se miden en cada tipo de sonda.

HEMOMÉDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMÉDICA S.R.

A continuación, el software BASIS importa los datos sin procesar referidos a la intensidad, evalúa la validez de los controles internos y, por último, genera los resultados del análisis.

En el análisis se han incorporado las mutaciones de las que tiene certeza que producen el silenciamiento (ausencia de expresión) de los antígenos Duffy (Fyb) [FY2] y MNS (S) [MNS3].

C. Descripción del producto

Los antígenos de grupos sanguíneos eritrocitarios humanos (los marcadores de superficie que se encuentran en la membrana de los glóbulos rojos) son proteínas polimórficas hereditarias. Si un paciente con antígenos negativos recibe sangre de un dador con antígenos positivos, podría producirse una respuesta inmunitaria (aloimmunización), en la que el sistema inmunitario del receptor de sangre desarrolla anticuerpos que pueden atacar y rechazar los glóbulos rojos del donante. Estas repuestas varían en su grado de severidad desde inmediatas y severas hasta una ausencia total de ellas [1]. Una vez que se produce un aloanticuerpo, se genera la inmunización de por vida, aun cuando el anticuerpo no sea detectable. En ciertas afecciones que requieren terapia de transfusión de sangre frecuente y crónica, como la anemia falciforme, la anemia hemolítica autoinmune y la anemia aplásica, aumentan las posibilidades de la aparición de un producto de aloanticuerpo. En tales casos, los estudios demuestran la utilidad de reforzar la caracterización de fenotipos serológicos con análisis de ADN a fin de identificar la presencia de antígenos de grupos sanguíneos [2][3].

El tratamiento perinatal o postnatal de la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (HDFN) puede complementarse con la identificación de los antígenos eritrocitarios humanos. La incompatibilidad menor de grupos sanguíneos se evidencia en aproximadamente el 0,8 % de las embarazadas y puede estar asociada con los grupos Kell, Kidd o Duffy (entre otros). La enfermedad anti-K puede ser severa a causa de hemólisis o supresión eritroide [4][5].

El Comité de la Sociedad Internacional para la Transfusión de Sangre (ISBT) conformado para la Terminología sobre Antígenos de Superficie de Eritrocitos se dedica a mantener y actualizar una base de datos de alelos conocidos para 35 sistemas de grupos sanguíneos. Ofrece información referida a la prevalencia y la importancia de los alelos en una población panétnica, al igual que datos sobre estándares para nomenclatura y terminología en la medicina transfusional [6].

En el análisis molecular PreciseType HEA BeadChip se incluyen veinticuatro polimorfismos asociados con 35 antígenos eritrocitarios humanos (Human Erythrocyte Antigens) y se enumeran en la tabla a continuación (Tabla 1) [7]. Asimismo se incluye un polimorfismo en el gen de la globina beta asociado con hemoglobinopatías (HbS). Si bien resultados de la detección de esta mutación no se presentan con fines de diagnóstico de enfermedades drepanocíticas. Sin embargo, permiten identificar unidades adecuadas en pacientes selectos, *por ejemplo*, en aquellos que presentan enfermedades drepanocíticas y neonatos. (Las unidades que arrojan un resultado positivo del rasgo no se utilizan para trasfudir a estas poblaciones de pacientes). [8]



Tabla 1: Marcadores genéticos para antígenos de eritrocitos en el análisis PreciseType HEA

Sistema de grupo sanguíneo	Analito	Polimorfismo	Fenotipo de ISBT	Genotipo de ISBT
Rh	c/C	307 C>T	RH4, RH2	RHCE*4, RHCE*2
		109 Ins		
	e/E	676 G>C	RH5, RH3	RHCE*5, RHCE*3
	VS V	733 C>G, 1006 G>T	RH20	RHCE*01.20.01, RHCE*01.20.02, RHCE*01.20.04, RHCE*01.20.05
	RH10			
Kell	K/k	698 T>C	KEL1, KEL2	KEL*01, KEL*02
	Js ^a /Js ^b	1910 C>T	KEL6, KEL7	KEL*06, KEL*07
	Kp ^a /Kp ^b	961 T>C	KEL3, KEL4	KEL*03, KEL*04
Duffy	Fy ^a /Fy ^b	125 G>A	FY1, FY2	FY*01, FY*02
	GATA (Silenciamiento de FY)	-67 T>C**	FY-2	FY*02N.01
	Fy ^a {Fy(b ⁺)}	265 C>T	FY2W	FY*02M
Kidd	JK ^a /JK ^b	838 G>A	JK1, JK2	JK*01, JK*02
MNS	M/N	59 C>T	MNS1, MNS2	GYPA*01, GYPA*02
	S/s	143 T>C	MNS3, MNS4	GYPB*03, GYPB*04
	Silenciamiento de S (Uvar, Uneg)	230C>T In5 g>t	MNS-3, 5W, MNS-3,-4,-5	GYPB*03N.01 o GYPB*03N.02 GYPB*03N.03 o GYPB*03N.04
Lutheran	Lu ^a /Lu ^b	230 A>G	LU1, LU2	LU*01, LU*02
Dombrock	Do ^a /Do ^b	793 A>G	DO1, DO2	DO*01, DO*02
	Hy+/Hy-	323 G>T	DO4	DO*04
	Jo(a+)/Jo(a-)	350 C>T	DO5	DO*05
Landsteiner-Wiener	LW ^a /LW ^b	308 A>G	LW5, LW7	LW*05, LW*07
Diego	Di ^a /Di ^b	2561 C>T	DI2, DI1	DI*02, DI*01
Colton	Co ^a /Co ^b	134 C>T	CO1, CO2	CO*01, CO*02
Scianna	Sc1/Sc2	169 G>A	SC1, SC2	SC*01, SC*02

** La mutación GATA que se indica aquí se ha informado previamente como -33 y -46 (ISBT Working Party)(9).

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAUL ZUCCHINI
Directora Técnica
M.N. 12.855
Página 13 de 174

II. CONTENIDO DEL KIT BEADCHIP, EQUIPO E INSUMOS REQUERIDOS

A. Contenido del kit PreciseType HEA

Número de pieza	Descripción	Cantidad *
800-00194	HEA 1.2 PCR Mix	2 x 900 µL
800-00191	Clean-up Reagent	1 x 330 µL
800-00195	Lambda Exonuclease	1 x 330 µL
800-00193	eMAP™ Elongation Mix	2 x 600 µL
800-10242	HotStarTaq® DNA Polymerase	1 x 155 µL
800-00287	Control negativo**	1 x 1000 µL
830-00056	HEA 8-BeadChip™ Carrier	12 portadores x 8 matrices BeadChip
830-00055	HEA 96-BeadChip™ Carrier	1 portador x 96 matrices BeadChip
800-20100	Análisis PreciseType BeadChip HEA Data CD	1

* Los reactivos líquidos se han sobrellenado para garantizar que se recupere la totalidad de la cantidad indicada.
** Agua grado PCR – Control de ausencia de DNA

B. Equipo requerido

Descripción	Número de catálogo
Sistema para Imaginología de Matriz (Array Imaging System) AIS 400	(BioArray) 790-20006, 790-20016
Congelador que no necesita descongelarse (congelador capaz de mantener temperaturas de -20 °C o inferiores)	-
Horno de hibridación (incubación) (Boekel InSlide Out™)	(Boekel) 241000
Refrigerador (capaz de mantener temperaturas de entre 2 °C y 8 °C)	-
Termociclador (Applied Biosystems Verit® Dx)	(Applied Biosystems) 4452300

C. Equipo recomendado

Descripción	Número de catálogo*			
Criobloque (se recomienda Denville o equivalente)	(Denville) R6670			
Centrífuga para microplacas (se recomienda Eppendorf Modelo 5430 o equivalente)	(Fisher) 05-400-017			
Gradillas para tubos de PCR (se recomienda Fisher Scientific o equivalente)	(Fisher) 05-541-50			
Campana para estación de trabajo PCR con luz UV (se recomienda CBS Scientific o equivalente)	(CBS Scientific) P-030-02			
Pipetas de precisión (multicanal) con capacidad de dispensar entre 0,5 µL y 10 µL (se recomienda Fisherbrand® o equivalente)	Vol. esperado	Exactitud	Precisión	(Fisher) 21-377-825
	0,5 µL	±12 %	<8 %	
Pipetas de precisión (multicanal) con capacidad de dispensar entre 5 µL y 50 µL (se recomienda Fisherbrand® o equivalente)	Vol. esperado	Exactitud	Precisión	(Fisher) 21-377-827
	5 µL	±5,0 %	<2 %	
Pipetas de precisión (canal único) con capacidad de dispensar entre 0,5 µL y 10 µL (se recomienda Eppendorf o equivalente)	Vol. esperado	Exactitud	Precisión	(Fisher) 13-684-250
	0,5 µL	±2,5 %	<1,8 %	
Pipetas de precisión (canal único) con capacidad de dispensar entre 10 µL y 100 µL (se recomienda Eppendorf o equivalente)	Vol. esperado	Exactitud	Precisión	(Fisher) 13-684-250
	10 µL	±1 %	<0,4 %	
Pipetas de precisión (canal único) con capacidad de dispensar entre 10 µL y 100 µL (se recomienda Eppendorf o equivalente)	Vol. esperado	Exactitud	Precisión	(Fisher) 13-684-250
	10 µL	±3,0 %	<1,0 %	
Pipetas de precisión (canal único) con capacidad de dispensar entre 10 µL y 100 µL (se recomienda Eppendorf o equivalente)	Vol. esperado	Exactitud	Precisión	(Fisher) 13-684-250
	100 µL	±0,8 %	<0,2 %	



Descripción	Número de catálogo*		
Pipetas de precisión (canal único) con capacidad de dispensar entre 100 µL y 1000 µL (se recomienda Eppendorf o equivalente)	Vol. esperado	Exactitud	Precisión
	100 µL	±3,0 %	<0,6 %
	1000 µL	±0,6 %	<0,2 %
QIAGEN® QIAcube®	(Fisher) 13-684-250		
Centrífuga para tubos (se recomienda Denville MiniMouse II™ o equivalente)	(Qiagen) 9001292		
Mezcladora de vórtice con adaptadores para tubos y pocillos de fondo plano (se recomienda Denville o equivalente)	(Denville) C0801		
	(Denville) S7030		

* Los números de pieza suministrados por los fabricantes de pipeta quedan sujetos a cambio; sírvase recurrir a la descripción al momento de realizar el pedido de insumos en caso de duda acerca de los números del catálogo.

D. Insumos requeridos

Descripción	Número de catálogo*
Tubos para centrífuga de 1,5 mL (se recomienda Eppendorf™ o equivalente)	(Fisher) 05-402-24B
Tubos para centrífuga de 2,0 mL (se recomienda Eppendorf™ o equivalente)	(Fisher) 05-402-24C
Tapones para banda de 8 microtubos de 0,2 mL de paredes finas para termociclador (se recomienda banda de 8 tapones Applied Biosystems MicroAmp® o equivalente)	(Applied Biosystems) N8010535
Banda de 8 microtubos de 0,2 mL de paredes finas para termociclador (se recomienda banda de 8 microtubos Applied Biosystems MicroAmp® de 2,0 mL o equivalente)	(Applied Biosystems) N8010580
Placa para PCR de 96 pocillos de polipropileno (PP) transparentes de 0,3 mL sin borde lateral (se recomienda Fisherbrand® o equivalente)	(Fisher) 14230232
Agua destilada de grado biológico molecular para lavado del BeadChip: se recomienda Invitrogen o equivalente	(Invitrogen) 10977023
Aire comprimido/en aerosol, libre de aceite (se recomienda Fisherbrand® o equivalente)	(Fisher) 23-022523
Descontaminante (se recomienda Molecular BioProducts™ DNA AWAY™ o equivalente)	(Fisher) 21-236-28
Kit para extracción de ADN (se recomienda el kit QIAGEN® QIAamp® DSP DNA Blood Mini o equivalente)	(Qiagen) 61104
Puntas para pipetas filtradas (resistentes a aerosoles) y descartables que cubran un rango de entre 0,1 µL y 1000 µL (se recomienda Eppendorf™ epTIPS™ filtradas o equivalentes)	(Fisher) 05-403-14 (Fisher) 05-403-18 (Fisher) 05-403-20
Sellos para placas PCR (se recomienda la película adhesiva transparente Biosystems® MicroAmp® o equivalente)	(Applied Biosystems) 4306311
Toallas de papel de alta calidad con múltiples pliegues (se recomienda la marca Uline o equivalente)	(Uline) 5-7127
Kit PreciseType™ HEA BeadCheck® Positive Control	(BioArray) 800-20236












* Los números de pieza suministrados por los fabricantes quedan sujetos a cambio; sírvase recurrir a la descripción al momento de realizar el pedido de insumos en caso de duda acerca de los números del catálogo.

HEMOMÉDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF 2010-35136696-ADN-DNPM#ANMAT
HEMOMÉDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
M.D. 12.855

III. DEFINICIÓN DE SÍMBOLOS

Los símbolos especiales que se presentan a continuación pueden encontrarse en los componentes del kit PreciseType HEA:

Símbolo	Definición
	Código de lote
	CD, que contiene archivos de datos e instrucciones de uso
	Contenido
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contiene una cantidad suficiente para <n> análisis
	Consultar instrucciones de uso
	Número de catálogo
	Límite de temperatura
	Usar antes de la fecha indicada
	Representante autorizado en la Comunidad Europea

- Utilice los reactivos del kit y los portadores HEA BeadChip, tal como se los provee. Su dilución o su alteración pueden generar resultados erróneos.
- No mezcle los reactivos ni los portadores HEA BeadChip de lotes diferentes.
- No utilice viales que presenten pérdidas o que no estén etiquetados.
- Antes de someterlos a análisis, las muestras o reactivos previamente congelados deben mezclarse y centrifugarse exhaustivamente luego de su descongelación. Evite generar espuma y burbujas en las muestras.
- Conserve todas las enzimas y mezclas maestras en hielo o en criobloque (entre 2 °C y 8 °C) durante su uso.
- Asegúrese de que todos los tubos de muestras estén correctamente sellados antes de proceder a la amplificación a fin de evitar la evaporación.
- Debido a las diferencias inherentes en los mecanismos de funcionamiento de los termocicladores, puede darse una variación en los resultados cuando los perfiles térmicos establecidos se transfieren entre diferentes marcas y modelos de instrumentos termocicladores. En algunos casos, la especificidad y la sensibilidad de la reacción pueden verse comprometidas, lo que daría origen a una falsa interpretación e informe incorrecto de datos. El análisis PreciseType HEA IVD aprobado por la FDA exige el uso del termociclador Applied Biosystems Veriti Dx. Immucor no emite aseveración alguna con respecto al desempeño del ensayo con el uso de termocicladores y perfiles alternativos, cuya validación será responsabilidad del usuario.
- Las muestras deben mantenerse en el pocillo de reacción BeadChip durante la realización del análisis.
- Los tiempos o temperaturas de incubación que difieran de los especificados pueden generar resultados erróneos.
- En cada día de uso, antes de poner en funcionamiento el sistema AIS 400, los usuarios deben llevar a cabo el procedimiento del Portador para análisis de exposición (Exposure Test Carrier o ETC) para verificar el desempeño del AIS. Si el análisis de exposición falla, comuníquese con el departamento de asistencia técnica para recibir las instrucciones pertinentes. (Véase el Manual del Usuario de AIS 190-20185).
- Si se aparta de las instrucciones recomendadas de uso, podría obtener un desempeño del producto que no alcance su grado óptimo. Según la naturaleza y la severidad de la desviación (muestra individual, al igual que fallas continuas), podrían ocasionarse fallas y/o resultados erróneos en el análisis. Por ejemplo, hemos determinado que el uso de un reactivo de limpieza insuficiente/inactivo en el análisis podría causar una alta incidencia de falsos resultados Kp(a)+.
- Los resultados de la mutación HbS en el gen de la globina beta no tienen como finalidad el diagnóstico de la anemia calciforme.



V. ENVÍO, ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Los reactivos PreciseType HEA, incluida la mezcla PCR y todas las enzimas, se envían en hielo seco. Cuando reciba el kit, confirme que en el paquete quede hielo seco. Si no hubiera hielo, no utilice el kit y comuníquese con el departamento de asistencia técnica. Asimismo, sírvase comunicarse con el departamento de asistencia técnica en caso de que el envase sellado al vacío del portador HEA BeadChip esté abierto o se haya dañado durante su transporte.

Almacene todos los reactivos de pruebas, incluida la mezcla de PCR y todas las enzimas, a entre -20 °C y -80 °C en un congelador que no requiera descongelarse. Cuando fuere posible, utilice criobloques para uso sobre la mesa de trabajo. Cuando se los almacena en estas condiciones y se los maneja correctamente, los reactivos sin abrir pueden utilizarse hasta la fecha de vencimiento. Una vez que se lo abre, el contenido de un kit de reactivo almacenado correctamente puede utilizarse durante seis meses, o bien hasta la fecha de vencimiento indicada, lo que ocurra primero. Al momento de abrir los kits de reactivos, los usuarios deben determinar cuál sería la fecha que ocurrirá primero; en caso de que la fecha de uso de seis meses ocurra antes que la fecha de vencimiento indicada, regístrela directamente en la caja del kit para garantizar que el kit no se utilice luego de su fecha de caducidad.

Almacene todos los portadores HEA BeadChip a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta su uso. Los portadores que no se utilicen deben volver a almacenarse de inmediato a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C en su envase original. Los portadores HEA BeadChip no pueden reutilizarse.

Consulte la fecha de vencimiento de todos los componentes del kit. No los use luego de cumplida la fecha de caducidad. El formato de la fecha de vencimiento es AAAA-MM-DD, lo que establece el uso permitido hasta la fecha indicada. Los componentes de este kit pueden tener una fecha de caducidad que excede la fecha de vencimiento de la totalidad del kit. El vencimiento más próximo (vale decir, la fecha de caducidad que habrá de ocurrir primero) de cualquiera de los componentes del kit se indicará en la etiqueta que se encuentra en la superficie exterior del kit.

VI. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES

Muestra: La totalidad de cada muestra de sangre debe colocarse en tubos con anticoagulante EDTA (por ej., números de producto BD 366643, 368661, 367654). El análisis PreciseType HEA no se ha sometido a pruebas con sangre de cordón umbilical ni con sangre cadavérica. (véase también la sección sobre Sustancias interferentes).

Las muestras de ADN deben extraerse con el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (N.º de catálogo QIAGEN 61104) siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. El uso de procedimientos alternativos requiere la validación por parte del cliente.

HEMOMÉDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

HEMOMÉDICA S.A.P.N.-DNPM#ANMAT
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
M.N. 12.855

Almacenamiento: El ADN genómico debe almacenarse hasta el momento de su uso a una temperatura de -20 °C o inferior en un congelador que no necesite descongelarse. Evite ciclos múltiples de congelamiento/descongelamiento.

Sustancias interferentes: La presencia de los inhibidores de la PCR como el citrato [10], la heparina [10], la hemoglobina, el etanol, etc., puede interferir con la reacción de la PCR.

Cantidad de ADN: Para un desempeño óptimo se requiere una concentración de ≥ 15 ng/ μ L de ADN genómico extraído.

VII. PROCEDIMIENTO

A. Programas del termociclador Veriti Dx

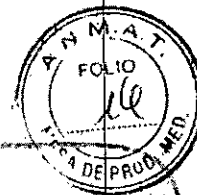
El termociclador Veriti se ofrece preprogramado para los nuevos clientes. Confirme los siguientes ajustes en su termociclador Veriti Dx antes de proceder a la realización del análisis. En caso de que deba programarlo, comuníquese con el departamento de asistencia técnica.

Asegúrese de seleccionar la opción de tapa calefaccionada en los tres programas a continuación.

Programa HEA PCR		
94 °C	15 minutos	
94 °C	30 segundos, rampa al 60 %	30 ciclos
60 °C	30 segundos, rampa al 50 %	
68 °C	50 segundos, rampa al 35 %	
68 °C	8 minutos	
4 °C	hasta 72 horas	

Programa HEA posterior a limpieza	
37 °C	25 minutos
80 °C	15 minutos
4 °C	hasta 3 horas

Programa HEA posterior a Lambda	
37 °C	25 minutos
80 °C	15 minutos
4 °C	hasta 3 horas



B. Notas procedimentales

- Para reducir o eliminar las probabilidades de contaminación cruzada, los usuarios deben asignar tres (3) áreas separadas en el laboratorio, incluidas: (1) actividades previas a la PCR/preparación, (2) Adición de ADN y (3) procedimientos posteriores a PCR.
 - Los pasos de la Sección C, "Preparación de mezcla maestra para PCR", deben llevarse a cabo en el área para actividades previas a la PCR, dentro de una campana para estación de trabajo de PCR o en una habitación limpia, usando puntas de pipeta resistentes a aerosoles (filtradas).
 - Se recomienda realizar los pasos de la Sección D, "Paso de adición de ADN", en el área destinada a la Adición de ADN, dentro de una campana especial o en una caja de aire limpio, usando puntas de pipeta resistentes a aerosoles (filtradas).
 - Los pasos restantes del procedimiento que siguen a la Sección E, "Amplificación de la PCR", deben llevarse adelante en el área posterior a PCR.
- Antes de su uso, limpie las superficies de las áreas de procesamiento con una solución de lejía al 10 % o con soluciones de descontaminación DNA AWAY, incluso:
 - Mesadas e interiores de campanas
 - Equipo de respaldo
 - Todas las pipetas en uso
 - Interior de la tapa de la centrífuga, gradillas y cubiertas
 - Superficies de la placa centrífuga
- Antes de usar el termociclador, limpie el interior de la tapa y los pocillos de la placa del termociclador con alcohol isopropílico (según las recomendaciones del fabricante) y enjuáguelos con agua desionizada. Use una solución de lejía al 10 % para eliminar la contaminación de el o los bloques de muestras de los instrumentos Veriti™; no obstante, el exceso en el uso de esta solución puede causar la corrosión del material de dichos bloques de muestras.
- Antes de utilizar la campana, encienda la luz UV durante un mínimo de entre 15 y 20 minutos.
- Retire del almacenamiento las cantidades requeridas de reactivos, muestras y controles y, en caso de estar congelados, deje que se descongelen antes de usarlos. Vuelva a almacenar adecuada e inmediatamente las porciones que no utilice.
- Use puntas filtradas para todos los pasos de pipeteo en los pasos procedimentales de este ensayo.
- Puede usar pipetas de canal único o de canales múltiples, según la preferencia de cada laboratorio. Todas las pipetas que se usen deben estar calibradas. La cantidad de reactivos que se proveen con cada kit de ensayo PreciseType es suficiente para pipetear las cantidades requeridas en este procedimiento.


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF 2010-75136525-ARN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHIN
Directora Técnica
M.N. 12.855

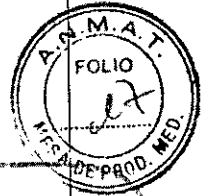
Página 21 de 174

- Se requiere un pipeteo preciso de las muestras y reactivos para lograr exactitud en los resultados.
- Asegúrese de mezclar adecuadamente las muestras y los reactivos. Evite que se forme espuma.
- Combine los reactivos que utilice inmediatamente antes de su uso.
- Conserve todos los reactivos en hielo o en un criobloque hasta su uso, cuando así corresponda. Verifique que el Termociclador Veriti Dx esté preprogramado para cada uno de los pasos de Amplificación de PCR y de Procesamiento posterior a PCR (Limpieza y generación de secuencia diana monocatenaria). Antes de cada paso, confirme que se haya seleccionado el perfil preprogramado adecuado.
- Se ha concluido que la contaminación del ADN tiene efectos adversos sobre los resultados de genotipo en el ensayo HEA a una concentración de >10 ng por reacción. La contaminación en el control negativo es detectable a una concentración muy inferior, a 0,2 ng por reacción.
- Se recomienda añadir el ADN luego de preparar la mezcla maestra de PCR en un proceso continuo.
- Puede usar una alfombra de compresión con la placa de PCR en el termociclador, si es necesario.
- Retire del almacenamiento los portadores HEA BeadChip y llévelos a temperatura ambiente antes de usarlos (suele tardar entre 15 y 20 minutos).
- Es de suma importancia evitar la contaminación cruzada entre los pocillos BeadChip. Tenga precaución al momento de realizar el pipeteo, el enjuague y la remoción de fluidos.
- Las soluciones BioArray del sistema AIS 400 y el horno de hibridación deben encenderse al menos 30 minutos antes de utilizarlos. Coloque dos toallas de papel en la bandeja del horno de hibridación y satúrelas con un total de 25 mL de agua desionizada a fin de mantener las condiciones de humedad durante la incubación.
 - Si el horno de hibridación se ha utilizado con anterioridad ese día, descarte las toallas de papel usadas e inserte dos toallas de papel nuevas; satúrelas como se indicó anteriormente con un total de 25 mL de agua desionizada.

C. Preparación de la muestra maestra de PCR

Medidas preventivas

- Siempre prepare la mezcla maestra de PCR dentro de una campana para estación de trabajo fr PCR a fin de evitar la contaminación cruzada (el espécimen de ADN debe añadirse fuera de la campana).
- Una vez preparada, la mezcla maestra PCR de trabajo debe utilizarse de inmediato, pero puede conservarse en un criobloque (a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C) o en hielo durante hasta 15 minutos.



- La placa para PCR puede cortarse en caso de que se trabaje con menos de 96 muestras. No obstante, deje una columna adicional en blanco para evitar la evaporación que podría ocasionarse por el plástico agrietado o por un sellado inadecuado.

Nota: Disponga las muestras y los controles en el orden en que se los añadirá a la placa para PCR. Registre las identificaciones de las muestras en el mapa de las placas de muestra en ese mismo orden. El mapa de placas se utilizará con posterioridad para proceder a la asociación de muestras (los mapas de muestras pueden crearse en Excel® o directamente en el software BASIS).

Nota: Se requiere un control negativo (control de ausencia de ADN), provisto en el kit, para cada tanda. Para cada tanda se requiere el uso de un Panel-A BeadCheck de Referencia y un Panel-B BeadCheck de Referencia (se venden por separado) a manera de controles positivos.

Procedimiento del ensayo

1. Preparación de reactivos y muestras

- 1.1 Quite la mezcla maestra de PCR (tapa amarilla) del congelador y descongélela a temperatura ambiente. Colóquela en criobloque (2 °C a 8 °C) una vez que esté completamente descongelada. Según el volumen de la mezcla de PCR, tarda entre 15 y 30 minutos en descongelarse. Sométala al agitador de vórtice y centrifúguela brevemente (alrededor de 3 a 5 segundos) antes de usarla.
- 1.2 Quite la HotStarTaq DNA Polymerase (tapa naranja) del congelador y colóquela en criobloque (2 °C a 8 °C) o en hielo. Sométala al agitador de vórtice y centrifúguela brevemente (alrededor de 3 a 5 segundos) antes de usarla.
- 1.3 Lleve el espécimen de ADN a temperatura ambiente. Sométalo al agitador de vórtice y centrifúguela brevemente (alrededor de 3 a 5 segundos) antes de usarlo.

2. Preparación de la mezcla maestra de PCR (en campana para estación de trabajo de PCR o en habitación limpia)

- 2.1 Determine la cantidad de muestras y controles que realizará.
- 2.2 Etiquete un tubo de ensayo para microcentrifuga de 1,5 o 2,0 mL para la mezcla maestra de PCR.
- 2.3 Prepare una mezcla maestra de PCR en un tubo para microcentrifuga con los volúmenes que se indican en la Tabla 2. Vuelva a almacenar adecuada e inmediatamente los reactivos luego de su uso.

Tabla 2: Preparación de mezcla maestra de PCR: volúmenes de reactivos

N.º de muestra	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Mezcla de PCR (µL)	16	144	296	448	592	736	880	1.008	1168	1.296	1.456	1.584	1.744
Poli-merasa de ADN HotStarTaq (µL)	1,0	9,0	18,5	28,0	37,0	46,0	55,0	63,0	73,0	81,0	91,0	99,0	109,0

*La tabla se ofrece a manera de guía, indicando aproximadamente entre 10 % y 20 % más de reactivo de trabajo que lo que se necesita para realizar el ensayo.

- 2.3.1 Coloque la cantidad adecuada de la mezcla de PCR HEA eMAP en los tubos identificados de la microcentrifuga utilizando la pipeta que corresponda. Sumerja lentamente la punta de la pipeta en el vial con reactivo para mezcla PCR a fin de evitar el sobrellenado y el derrame.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Calleo Caracas

IF 21036524 - APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAOLA ZUCCHINI
Directora Técnica
M.N. 12.855

- 2.3.2 Dispense la cantidad adecuada de HotStarTaq en el tubo con mezcla de PCR; para ello use una pipeta adecuada y **mezcle tres veces**. Vuelva a colocar de inmediato los reactivos en el criobloque (aprox. 2 °C a 8 °C), en hielo o en el congelador luego de su uso.
- 2.3.3. Ajuste el tapón del tubo con la mezcla maestra de PCR y sométalo brevemente al agitador de vórtice y centrifúguelo (aproximadamente entre 3 y 5 segundos). Cuando realice el pipeteo de forma manual, conserve en un criobloque (aprox. 2 °C a 8 °C) o en hielo hasta el momento de su uso.
- 2.4 Dispense la cantidad adecuada de mezcla maestra de PCR en una banda de 8 microtubos según los volúmenes indicados en la tabla a continuación y realice una inspección visual de cada tubo:

Tabla 3: Mezcla maestra de PCR de trabajo: volúmenes de transferencia

N.° de muestra	1-8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Mezcla de PCR (µL)	Añada 17 µL directamente a la placa para PCR	37,0	57,0	76,0	94,0	112,0	128,0	148,0	164,0	188,0	200,0	224,0

- 2.5 Prepare una placa para PCR de 96 pocillos y etiquétela debidamente.
- 2.6 Dispense **17,0 µL** de **mezcla maestra de PCR** en el fondo de cada pocillo de la placa para PCR etiquetada, que se encontrará en un criobloque (2 °C a 8 °C) o en hielo (puede usarse una pipeta adecuada) cuando se realice el pipeteo de modo manual. Deseche la mezcla maestra PCR que no se haya utilizado

D. Adición de muestras de ADN

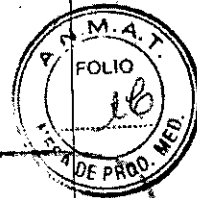
Medidas preventivas

- Encienda el termociclador aproximadamente 10 minutos antes de dar inicio al ciclo de PCR.
- Comience a añadir el ADN y los controles a la mezcla maestra de PCR de trabajo fuera de la campana a la mayor brevedad posible, pero sin excederse del lapso de 15 a 20 minutos cuando se realiza el pipeteo manual.
- Cuando proceda al pipeteo manual, conserve las muestras y la mezcla maestra de PCR de trabajo en un criobloque (entre 2 °C a 8 °C) o en hielo durante estos pasos.

Nota: Verifique el orden de las muestras y su identificación en el mapa para placas de muestras.

Procedimiento del ensayo

1. Someta el espécimen de ADN al agitador de vórtice y centrifúguelo brevemente (alrededor de 3 a 5 segundos) antes de usarlo.
2. Añada **8,0 µL** del control negativo que corresponda (suministrado en la caja del kit de reactivos PreciseType HEA) en el pocillo de la placa de PCR adecuado utilizando la pipeta que corresponda. Mezcle tres veces mediante aspiración y dispensación de pipeta para garantizar la transferencia completa del control negativo.
3. Añada **8,0 µL** de los controles positivos requeridos (N.° de catálogo 800-20236) a los pocillos de la placa de PCR que corresponda utilizando la pipeta correspondiente. Mezcle tres veces mediante aspiración y dispensación de pipeta para garantizar la transferencia completa de los controles positivos.



4. Añada **8,0 μ L** de muestra de ADN en los pocillos de la placa para PCR pertinente con una pipeta adecuada.
Mezcle tres veces mediante aspiración de pipeta para garantizar la transferencia completa de ADN.
5. Selle bien la placa para PCR con sellador adhesivo térmico para placas. Asegúrese de que los pocillos estén sellados por completo para evitar la evaporación.
6. Sométalo al agitador de vórtice a velocidad media durante aproximadamente **3 a 5 segundos**.
7. Sométalo brevemente a la centrifuga (~5 segundos) aproximadamente a 1000 rpm para que las muestras queden en el fondo de los pocillos.

Análisis molecular PreciseType HEA BeadChip | 190-20210-LA Rev. C | Octubre de 2016


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Ejecutivo Comercial

IF-2019-75136528-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAUL ZUCCHINI
Directora Técnica
MEX. 12-855
Página 25 de 174

E. Amplificación de PCR

Medidas preventivas

- Las muestras y los controles centrifugados y amplificados deben usarse de inmediato, pero pueden almacenarse a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (o inferior) durante hasta 4 semanas.

Procedimiento del ensayo

- Coloque la placa para PCR en el centro del termociclador.
- Cierre la tapa y baje la manija.
- Inicie la sesión en el termociclador y seleccione "**Browse/New Methods**" (**Buscar/Nuevos métodos**).
- Seleccione el programa "HEA PCR" y presione "**View**" (**Ver**) para confirmar que el programa sea el correcto:

Ciclos	1	30			1	1
Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	94 $^{\circ}\text{C}$	94 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$	68 $^{\circ}\text{C}$	68 $^{\circ}\text{C}$	4 $^{\circ}\text{C}$
Tiempo	15 min	30 seg	30 seg	50 seg	8 min	Hasta retirarlo (máximo de 72 horas)
Rampa	100 %	60 %	50 %	35 %	100 %	100 %

- Presione "**Run**" (**Ejecutar**). El volumen del reactivo debe ser de **25,0 μL** . Confirme que los ajustes de la Cubierta sean de **105 $^{\circ}\text{C}$** y que no esté seleccionada la opción "Do Not Heat Cover" (No calentar la cubierta).
- Pulse "**Start Run Now**" (**Ejecutar ahora**) para comenzar el proceso y confirmar que se ha iniciado el programa.
- Quite la placa de PCR del termociclador una vez que el programa alcance los **4 $^{\circ}\text{C}$** y centrifugue brevemente (~ 5 segundos) a aproximadamente 1000 rpm. La placa de PCR debe retirarse del termociclador a **4 $^{\circ}\text{C}$** antes de transcurridas 72 horas.



F. Procesamiento posterior a PCR: Limpieza

Medidas preventivas

- Los pasos de la Sección F deben realizarse de forma continua sin interrupción en el área designada para actividades posterior a PCR cuando se realiza el pipeteo manual.
- Cuando se procede al pipeteo manual, el reactivo de limpieza debe añadirse al producto posterior a PCR antes de transcurridos alrededor de 30 minutos de retirar los productos de la PCR del termociclador con posterioridad a la amplificación de PCR o, en caso de estar congelados, antes de transcurridos los 30 minutos de descongelarse.
- La placa para PCR puede cortarse en caso de que se trabaje con menos de 96 muestras. No obstante, deje una columna adicional en blanco para evitar la evaporación que podría ocasionarse por el plástico agrietado o por un sellado inadecuado.
- El reactivo de limpieza y el producto de la PCR deben descongelarse a temperatura ambiente y conservarse en un criobloque (aprox. 2 °C a 8 °C) o en hielo hasta su uso.
- Cuando se transfiere el producto posterior a PCR y el reactivo de limpieza a placas para posterior a PCR nuevas, deberán conservarse en un criobloque (entre 2 °C y 8 °C) o en hielo durante estos pasos cuando se realiza el pipeteo de forma manual.
- Las muestras y controles limpios y centrifugados pueden usarse de inmediato o almacenarse a -20 °C (o menos) durante un máximo de 72 horas.

Procedimiento del ensayo

1. Retire el reactivo de limpieza (tapón verde) del congelador **entre 10 y 15 minutos** antes de su uso y colóquelo en criobloque (entre 2 °C y 8 °C) o en hielo cuando realice el pipeteo de forma manual. Sométala al agitador de vórtice y centrifúguela brevemente (alrededor de 3 a 5 segundos) antes de usarla.
2. Descongele los productos de PCR a temperatura ambiente (si corresponde). Someta los productos de PCR al agitador de vórtice a velocidad media durante aproximadamente 3 a 5 segundos. Sométalos brevemente a la centrifuga (~5 segundos) aproximadamente a 1000 rpm para que los productos de PCR queden en el fondo de los microtubos/pocillos. Coloque en un criobloque (entre 2 °C y 8 °C) o en hielo cuando realice el pipeteo de forma manual.
3. Determine la cantidad de muestras y controles que realizará.
4. Prepare una nueva placa para PCR que se destinará para el procesamiento posterior a PCR y etiquétela debidamente.
5. Coloque la placa para productos de PCR en la misma orientación que la placa para actividades posteriores a la PCR en un criobloque (entre 2 °C y 8 °C) cuando realice el pipeteo de forma manual.
6. Traslade **6,5 µL** de cada producto de PCR al fondo del pocillo correspondiente de la nueva placa para actividades posteriores a la PCR utilizando la pipeta que corresponda.
7. Selle la placa que contenga el resto de los productos de PCR y almacénela en el congelador a una temperatura de entre **-20 y -80 °C** hasta que finalice correctamente la ejecución del ensayo.
8. Cuando realice el pipeteo de forma manual, recurra a la siguiente tabla para determinar el volumen correcto; luego dispense reactivo de limpieza en una banda de 8 microtubos con una pipeta adecuada y realice una inspección visual de cada tubo. Vuelva a almacenar adecuada e inmediatamente los reactivos luego de su uso.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. BEINOSO
Soc. en Cda. Ltda

IF 2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
M.N. 12.855
Página 27 de 174

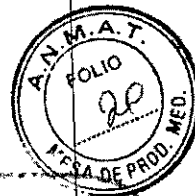
Tabla 4: Volúmenes de reactivos de limpieza

N.º de muestra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Reactivo de limpieza (µL)	Añada 2 µL directamente a la placa posterior a PCR	6,0	9,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0	24,0	26,0	28,0

9. Dispense **2,0 µL** de reactivo de limpieza en cada pocillo de la placa para actividades posteriores a la PCR usando una pipeta adecuada. Mezcle cada pocillo tres veces mediante aspiración de pipeta.
10. Después de añadir el reactivo de limpieza a todos los pocillos de muestra en la placa para actividades posteriores a la PCR, deseche la banda de 8 microtubos.
11. Selle bien la placa para actividades posteriores a la PCR con sellador adhesivo térmico para placas.
12. Sométala al agitador de vórtice a velocidad media durante aproximadamente **3 a 5 segundos**.
13. Sométala brevemente a la centrifuga (~5 segundos) aproximadamente a 1000 rpm para que las muestras queden en el fondo de los pocillos.
14. Coloque la **placa para actividades posteriores a la PCR** en el centro del termociclador.
15. Cierre la tapa y baje la manija.
16. Inicie la sesión en el termociclador y seleccione "**Browse/New Methods**" (Buscar/Nuevos métodos).
17. Seleccione el programa "HEA Clean-Up" (Limpieza HEA) y presione "**View**" (Ver) para verificar que el programa sea el correcto:

Ciclos	1	1	1
Temp. (C°)	37 °C	80 °C	4 °C
Tiempo	25 min	15 min	Hasta retirarlo (máximo de 3 horas)
Rampa	100 %	100 %	100 %

18. Presiones "**Run**" (Ejecutar) El volumen del reactivo debe ser de **10,0 µL**. Confirme que los ajustes de la Cubierta sean de 105 °C y que no esté seleccionada la opción "Do Not Heat Cover" (No calentar la cubierta).
19. Pulse "**Start Run Now**" (Ejecutar ahora) para comenzar el proceso y confirmar que se ha iniciado el programa.
20. Quite la placa de PCR del termociclador una vez que el programa alcance los 4 °C y centrifuge brevemente (~5 segundos) a aproximadamente 1000 rpm. La placa de PCR debe retirarse del termociclador a 4 °C antes de transcurridas 3 horas. Las muestras y los controles centrifugados y amplificados deben usarse de inmediato, pero pueden almacenarse a una temperatura de -20 °C (o inferior) durante hasta 72 horas.



G. Procesamiento posterior a PCR: Generación de secuencia diana monocatenaria

Medidas preventivas

- Los pasos en la Sección G deben realizarse de forma continua y sin interrupción.
- La Exonucleasa Lambda debe retirarse del congelador para que se descongele durante el paso del reactivo de limpieza para la incubación posterior a PCR de la Sección F. Una vez descongelada, la Exonucleasa Lambda debe conservarse en un criobloque (entre 2 °C y 8 °C) o en hielo durante su transferencia al producto de reactivo de limpieza posterior a PCR cuando se realiza el pipeteo manual.
- El producto de reactivo de limpieza posterior a PCR debe conservarse en un criobloque (entre 2 °C y 8 °C) o en hielo durante estos pasos una vez que se descongela (si estuviera previamente congelado).
- Añada la Exonucleasa Lambda al producto de reactivo de limpieza posterior a PCR antes de transcurridos alrededor de 30 minutos de haberse completado el proceso de limpieza cuando se realiza el pipeteo manual.
- Las muestras y los controles centrifugados monocatenarios deben usarse de inmediato, pero pueden almacenarse a una temperatura de -20 °C (o inferior) durante hasta 72 horas.

Procedimiento del ensayo

1. Retire el reactivo Lambda (tapón violeta) del congelador entre 10 y 15 minutos antes de su uso. Descongele a temperatura ambiente. Sométala al agitador de vórtice y centrifúguela brevemente (alrededor de 3 a 5 segundos) antes de usarla.
2. Descongele los productos de limpieza a temperatura ambiente (si corresponde). Someta los productos de limpieza al agitador de vórtice a velocidad media durante aproximadamente 3 a 5 segundos. Sométalos brevemente a la centrifuga (~5 segundos) aproximadamente a 1000 rpm para que los productos de limpieza queden en el fondo de los microtubos/pocillos.
3. Coloque la placa para actividades posteriores a la PCR ("Productos de limpieza") en un criobloque (entre 2 °C y 8 °C) cuando realice el ensayo manualmente.
4. Cuando realice el pipeteo de forma manual, recurra a la siguiente tabla para determinar el volumen correcto; luego dispense Reactivo Lambda en una banda de 8 microtubos y realice una inspección visual de cada tubo. Vuelva a almacenar adecuada e inmediatamente los reactivos luego de su uso.

Tabla 5: Volúmenes de Exonucleasa Lambda

N.º de muestra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volumen de reactivo Lambda (µL)												
Añada 2 µL directamente a la placa posterior a PCR	6,0	9,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0	24,0	26,0	28,0	

5. Dispense **2,0 µL** de reactivo Lambda en cada pocillo de la placa para posterior a PCR usando una pipeta adecuada. Mezcle cada pocillo tres veces mediante aspiración de pipeta.
6. Descarte la banda de 8 microtubos tras añadir el reactivo Lambda en todos los pocillos de muestra.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
M.N. 12.855
Página 29 de 174

7. Selle bien la placa para actividades posteriores a la PCR con sellador de placas adhesivas para termociclador.
8. Sométala al agitador de vórtice a velocidad media durante aproximadamente **3 a 5 segundos**.
9. Sométala brevemente a la centrifuga (~5 segundos) aproximadamente a 1000 rpm para que las muestras queden en el fondo de los pocillos.
10. Cargue la placa para PCR en el termociclador y ejecute el programa "HEA Lambda". Presione "View" (Ver) para confirmar que el programa es correcto:

Ciclos	1	1	1
Temp. (C°)	37 °C	80 °C	4 °C
Tiempo	25 min	15 min	Hasta retirarlo (máximo de 3 horas)
Rampa	100 %	100 %	100 %

11. Presione "Run" (Ejecutar). El volumen del reactivo debe ser de **12,0 µL**. Confirme que los ajustes de la Cubierta sean de **105 °C** y que no esté seleccionada la opción "Do Not Heat Cover" (No calentar la cubierta).
12. Pulse "Start Run Now" (Ejecutar ahora) para comenzar el proceso y confirmar que se ha iniciado el programa.
13. Quite la placa de PCR del termociclador una vez que el programa alcance los 4 °C y centrifugue brevemente (~5 segundos) a aproximadamente 1000 rpm. La placa de PCR debe retirarse del termociclador a 4 °C antes de transcurridas 3 horas. Las muestras y los controles centrifugados y amplificados deben usarse de inmediato, pero pueden almacenarse a una temperatura de -20 °C (o inferior) durante hasta 72 horas.

H. Elongación en matriz BeadChip

Medidas preventivas

- Los pasos en la Sección H deben realizarse de forma continua y sin interrupción.
- El reactivo de elongación deben sacarse del congelador para que se descongele durante el paso de la incubación de Generación de secuencia diana monocatenaria en la Sección G.
- Una vez descongelado, el reactivo de elongación debe conservarse en un criobloque (entre 2 °C y 8 °C) o en hielo cuando se realiza el pipeteo de modo manual.
- Evite que se forme espuma al pipetear el reactivo de elongación.
- Cuando se realiza el pipeteo de forma manual, este reactivo añadirse al producto monocatenario antes de transcurridos aproximadamente 30 minutos de la compleción del proceso de generación de secuencia diana monocatenaria.
- No agite el aire comprimido en aerosol.

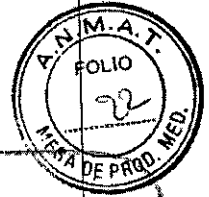
Procedimiento del ensayo

1. Prepare el horno Boekel **al menos 30 minutos antes de usarlo.**
 - 1.1 Encienda el horno Boekel y verifique el ajuste de temperatura (53 °C); para ello, mantenga oprimido el botón "****".
 - 1.2 Retire la bandeja interior. Cubra la bandeja con dos toallas de papel y satúrela con 25 mL de agua desionizada.
 - 1.3 Vuelva a colocar la tapa sobre la bandeja e insértela nuevamente en el horno Boekel para precalentarla.
2. Retire el o los portadores BeadChip del refrigerador entre **15 y 20 minutos antes de su uso.**
3. Retire el reactivo Lambda (tapón violeta) del congelador entre **10 y 15 minutos** antes de su uso, y descongele a temperatura ambiente. Cuando realice el pipeteo de forma manual, coloque en un criobloque (entre 2 °C y 8 °C) una vez que esté completamente descongelado. Sométala al agitador de vórtice y centrifúguela brevemente (alrededor de 3 a 5 segundos) antes de usarla.
4. Descongele los productos Lambda a temperatura ambiente (si corresponde). Someta los productos Lambda al agitador de vórtice a velocidad media durante aproximadamente 3 a 5 segundos. Sométalos brevemente a la centrifuga (~5 segundos) aproximadamente a 1000 rpm para que los productos Lambda queden en el fondo de los microtubos/pocillos.
5. Coloque la **placa para actividades posteriores a la PCR** ("Productos Lambda") en un criobloque (entre 2 °C y 8 °C) cuando realice el pipeteo manualmente.
6. Cuando realice el pipeteo de forma manual, recurra a la siguiente tabla para determinar el volumen correcto; luego dispense el reactivo de elongación en una banda de 8 microtubos y realice una inspección visual de cada tubo. Vuelva a almacenar adecuada e inmediatamente los reactivos luego de su uso.

Tabla 6: Volúmenes de mezcla de elongación eMAP

N.º de muestra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Reactivo de elongación eMAP (µL)	Añada 10 µL directamente a la placa posterior a PCR	25,0	36,0	47,0	59,0	70,0	80,0	90,0	100,0	114,0	125,0	135,0

7. Dispense **10,0 µL** de reactivo de elongación eMAP en cada pocillo de la placa de PCR usando una pipeta adecuada. Mezcle cada pocillo tres veces mediante aspiración de pipeta.
8. Descarte la banda de 8 microtubos tras añadir el reactivo de elongación en todos los pocillos de muestra.
9. Retire el o los portadores BeadChip del envase de papel aluminio y ordénelos numéricamente.
10. Coloque con cuidado el o los portadores BeadChip sobre el soporte para portador BeadChip sin tocar la superficie del BeadChip.
11. Registre la identificación del portador BeadChip en el mapa de placas de muestra según corresponda.
12. Traslade **15,0 µL** de la mezcla del reactivo de elongación eMAP al BeadChip correspondiente utilizando una pipeta adecuada. Realice una inspección visual de las puntas de pipeta y asegúrese de que la orientación del portador sea la misma que se registra en el mapa de placas de muestra.
13. Retire la bandeja precalentada del horno Boekel. Si observa condensación en el interior de la cubierta de la tapa, séquela con un paño sin pelusas.
14. Coloque el portador BeadChip en la bandeja del horno Boekel y tape por completo la bandeja.
15. Coloque la bandeja en el horno, trábela firmemente, cierre la puerta del horno Boekel y programe el temporizador en 30 minutos. Incube los portadores BeadChip a **53±1 °C durante 30 minutos**. (Recuerde que: si tiene previsto realizar una lectura del portador inmediatamente tras la elongación, encienda el Sistema de Imagenología de Matriz BioArray AIS 400 y cargue el CD cuando inicie el proceso de incubación).
16. Retire el portador BeadChip del horno luego de 30 minutos.
17. Use la botella para lavado con agua desionizada para lavar las superficies de Beadchip y eliminar la mezcla de elongación:
 - 17.1 Sostenga el portador BeadChip de modo que su superficie quede en posición vertical sobre un lavabo o receptáculo de captación.
 - 17.2 Enjuague cada BeadChip de forma individual durante aproximadamente **3 segundos**. El chorro de agua debe dirigirse de modo perpendicular hacia la superficie del BeadChip a una distancia aproximada de una pulgada (2,54 cm).
18. Retire el exceso de agua de las superficies de BeadChip con aire comprimido/en aerosol. **¡Precaución! ¡No agite el aire comprimido en aerosol!**
19. Retire todo resto de agua de la parte posterior de el o los portadores con un paño que no deje pelusas.
20. Si no puede leer los portadores HEA BeadChip lavados y secados de inmediato después de la incubación, puede almacenarlos protegidos de la luz solar durante un máximo de 72 horas a temperatura ambiente antes de leerlos con el sistema BioArray AIS 400.



I. Adquisición de imágenes de BeadChip

Medidas preventivas

- Encienda la fuente de luz del sistema BioArray AIS 400 y la computadora al menos 30 minutos antes de su uso.
- Cargue el CD de datos de Ensayo PreciseType BeadChip | HEA una vez por cada lote.

Procedimiento del ensayo

1. Abra e inicialice el programa AISR en el escritorio.
2. Ejecute el ETC (Consulte el Manual del Usuario de AIS 190-20185). Si los resultados se apartan de las especificaciones, comuníquese con el departamento de asistencia técnica para ajustar el tiempo de exposición antes de proceder.
3. Quite el Análisis PreciseType BeadChip | HEA Data CD de la caja del portador BeadChip y cargue los archivos del CD a la computadora para cada lote nuevo.
4. Realice la lectura de el o los portadores HEA BeadChip con el Sistema de Imaginología de Matriz [Array Imaging System] BioArray AIS 400.
Procese los datos BeadChip con el software de Análisis HEA del sistema BASIS.

Nota: Si es necesario volver a realizar alguna tarea, consulte el Manual del usuario del AIS 190-20185 para obtener más instrucciones

5. Proceda al correcto apagado del AISR y de la fuente de luz luego de su uso.
6. Prosiga con BASIS para realizar la asociación de muestras y generar los informes BeadChip.

VIII. RESULTADOS PREVISTOS

A. Evaluación: control de calidad

El software de BASIS determina automáticamente la validez de las tandas y las muestras.

Validez de la tanda: Para cada tanda se requieren dos controles positivos y un control negativo, tal como se los provee. Los resultados de todos los controles deben cumplir con los criterios de validez de la tanda. Si cualquiera de los controles no cumple con alguno de los criterios, la tanda se considera inválida y debe repetirse.

Si la imagen de matriz de BeadChip para un control negativo o una muestra similar a un control negativo genera un "Error en la generación del archivo de intensidad de imagen" en el Informe resumido de AIS debido a bajos niveles de fluorescencia, realice lo siguiente:

- Revise la imagen al hacer clic sobre la imagen en miniatura en el software AIS
- Vuelva a lavar y a realizar el procedimiento detallado en el Manual del usuario del AIS (190-20185)
- Antes de realizar la modificación del AIS, inspeccione el chip que volvió a lavar bajo el microscopio para asegurarse de haber eliminado todo el exceso de suciedad/material extraño de la superficie de la matriz BeadChip y del área circundante a ella.
- Si el error persiste, comuníquese con el Soporte Técnico para obtener ayuda, lo cual podría incluir utilizar el software de análisis de imágenes para realizar la función de mapeo de forma manual para generar el archivo de datos resultante

Si los resultados de Señal baja (Low Signal o LS) es <32 en el informe de fenotipo correspondiente a la muestra del control negativo, puede indicar contaminación a causa de gDNA en una cantidad tal que puede afectar los resultados del ensayo. Cuando esto ocurre, todos los resultados de las muestras de la tanda son inválidos.

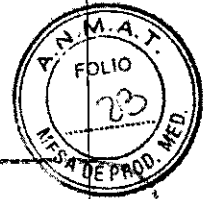
El patrón de fenotipos de las muestras de los dos controles positivos deben concordar con el patrón de fenotipo esperado. Si cualquiera de los resultados de los controles no cumple con alguno de los criterios, todos los resultados de las muestras de la tanda son inválidos. Véase el prospecto de PreciseType BeadCheck (N/P 190-20229) para más detalles.

Consulte el Manual del Usuario de BASIS AM 4G (190-20331) para obtener más información sobre el software BASIS y para conocer ejemplos de cómo se presentan los resultados de las muestras de las tandas válidas e inválidas.

La interpretación de la validez de los controles positivos y negativos se describe en la Tabla 7:

Tabla 7: Criterios de validez de la tanda

Control	Análisis BASIS	Resultado informado	Interpretación
Negativo	$LS \geq 32$	Valid NC	Control negativo válido
Negativo	$LS < 32$	Invalid NC	Control negativo inválido; no se informa ningún resultado para ninguna de las muestras de la tanda
Positivo	El patrón de fenotipo concuerda con el patrón previsto para los dos controles positivos del kit BeadCheck	HEA Ref-pA válido y HEA Ref-pB válido	Control positivo válido
Positivo	El patrón de fenotipo no concuerda con el patrón previsto de ninguno de los dos controles positivos del kit BeadCheck	HEA Ref-pA inválido y HEA Ref-pB inválido	Control positivo inválido; no se informa ningún resultado para ninguna de las muestras de la tanda



Validez de los resultados de las muestras: Para que los resultados de las muestras se consideren válidos, los resultados de los fenotipos de todos los antígenos deben ser válidos (para una lista de causas de resultados de muestras inválidos, véase la Tabla 8 a continuación). Consulte el Manual del Usuario de BASIS AM 4G (190-20331, Secciones 6 y 7) para obtener más información sobre el software BASIS y para conocer ejemplos de cómo se presentan los resultados válidos e inválidos de las muestras.

Si el resultado de una muestra refleja un fenotipo de antígeno o bien Característica indeterminada (IC) o bien Baja señal (LS), la muestra es inválida, salvo en el caso de S y s donde Baja señal (LS) es un fenotipo previsto en conjunto con los resultados U negativos. Si la muestra presenta un estado de Fondo alto (High Background o HB) o bien un Alto coeficiente de varianza (Coefficient of Variation o CV), la muestra es inválida (para una lista de causas de muestras inválidas, véase la Tabla 8 a continuación; para una explicación más detallada, véase la Sección XII, Posibles mensajes de advertencia contenidos en el informe BASIS).

Tabla 8: Causas de resultados inválidos de muestras

Causa	Interpretación
IC ≥ 1	Característica indeterminada
LS ≥ 1	Baja señal
HB	Fondo alto
CV	Alto coeficiente de varianza

En el caso de las muestras que sean parte de una tanda inválida o que en sí mismas tengan fenotipos inválidos (resultados inválidos de muestras), todos los resultados de fenotipos de antígenos se informan como Sin determinación de tipo (No Type Determined o NTD).

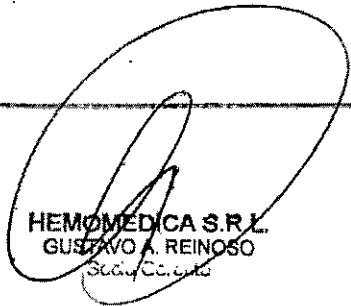
B. Análisis de los resultados

Esta prueba es de carácter cualitativo. El software BASIS computa los datos de la intensidad de señal de la matriz BeadChip de cada oligonucleótido; para ello detecta alelos específicos a fin de determinar la presencia o la ausencia de cada alelo o el resultado de genotipo. A continuación, los resultados de genotipo se usan para computar los resultados previstos para los fenotipos de antígenos.

El software de análisis HEA en BASIS realiza automáticamente todos los cálculos. Sirvase consultar el Manual del Usuario BASIS (N/P 190-20331) para obtener más detalles. Los resultados previstos de genotipos se presentan en la Tabla 10 a continuación (para una explicación más detallada de los resultados Ax y xB, véase la sección XII referida a Resolución de problemas).

En el caso de las muestras que sean parte de una tanda inválida o que en sí mismas tengan genotipos inválidos (muestra inválida), todos los resultados de genotipos se informan como Sin determinación de tipo (No Type Determined o NTD).

Análisis molecular PreciseType HEA BeadChip | 190-20210-LA Rev. C | Octubre de 2016


HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
 PAUL KZUCCHINI
 Directora Técnica
 Página 12 de 55

C. Fenotipo y genotipo

En el caso de las muestras con resultados válidos, los resultados previstos de fenotipos se presentan en la Tabla 9 a continuación, a la vez que los resultados previstos de genotipos se presentan en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 9: Resultados previstos de fenotipos

Resultado informado	Interpretación
+	Positivo
0	Negativo
(+)*	Posible haplotipo (C)ce
(0)*	Variante Fyb
PV	Variante posible
var	Variante U (Mutación de silenciamiento de S)
w	Fyb débil
++	HbS homocigoto

Tabla 10: Resultados previstos de genotipos

Resultado informado	Interpretación
AA	Homocigoto para A
AB	Heterocigoto
Ax	Característica indeterminada en B
BB	Homocigoto para B
xB	Característica indeterminada en A
IC	Característica indeterminada en A y en B

Nota: Para el inserto RhCE-109, un control positivo de amplicón se corresponde con la sonda "A" y una sonda específica de inserción 109-bp se corresponde con la sonda "B", por ende:

- Si RhCE-109Ins=AA, la inserción 109-bp está ausente, lo que indica C-.
- Si RhCE-109Ins=AB, la inserción 109-bp está presente en uno de los alelos, lo que indica C+.
 - No hay RhCE-109Ins=BB dado que el control positivo siempre está presente.
- Cuando P103 es positivo (RhCE-P103S=AA, Ax o AB), la sonda RhCE-109Ins se utiliza para la predicción del fenotipo C:
 - Si RhCE-109Ins=AA, el fenotipo es cc.
 - Si RhCE-109Ins=AB, el fenotipo es cC.
- Cuando RhCE-P103S=BB, el fenotipo es CC, con independencia del estado de RhCE-109Ins.



IX. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los resultados de falso negativo o inválidos pueden generarse cuando una o más mutaciones raras no anticipadas que afectan el enlace del cebador o de la sonda causan la pérdida de alelos o amplicones. Si se sospecha una mutación que influye sobre el enlace del cebador o de la sonda como causa de origen de un resultado de muestra inválido (NTD), comuníquese con Soporte Técnico. Si los resultados de la investigación confirman la presencia de la mutación, previa solicitud se realizará un informe de los fenotipos del antígeno no afectados en la muestra en cuestión.
 - La presencia de híbridos RH y las mutaciones de variantes en los exones 2, 5 y 7 al igual que en intrones 1, 2, 4, 5, 6 y 7 del gen RHCE puede interferir con la detección del antígeno E/e y C/c. Las mutaciones en el gen RHCE que originan el fenotipo ceMO [13],[14], que se expresa como un Rhe débil, pueden causar una supresión directa de la sonda Rhe y provocar un resultado inválido o de falso negativo. En poblaciones específicas, como pacientes afrocaribeños con anemia falciforme, se ha informado que la prevalencia del fenotipo ceMO alcanza hasta el 2 % [19].
 - La presencia de un cambio +3g>a raro en el intrón 5 de GYPB interfiere con la detección del antígeno S y puede llevar a un tipaje de falso negativo del antígeno S [17].
 - La mutación HbS en el gen de globina beta no debe usarse para la determinación de la anemia falciforme. La presencia de enfermedad HbSC interfiere con la detección de la mutación HbS en la mutación del gen de la globina beta y puede dar como resultado un fenotipado HbS inválido o inexacto (HbS (++) en lugar de HbS (+)). En Estados Unidos, la enfermedad HbSC tiene una prevalencia de 0,017 % entre los afroamericanos [20]. La presencia de algunos desórdenes de talasemia beta puede interferir con la detección de la mutación HbS en el gen de la globina beta y puede causar un fenotipado HbS inválido.
 - La presencia de la mutación Mit+(GYPB 161G>A) puede dar como resultado un tipaje inválido o de falso negativo del antígeno S. La mutación tiene una prevalencia del 0,1 % entre los europeos occidentales [6].
 - La presencia de una mutación GYPB (c. 137-8C>T) puede dar como resultado un tipaje inválido o de falso negativo del antígeno S.
- Los resultados de falso positivo o inválido pueden darse en casos raros en los que una muestra contenga ejemplos de eventos moleculares que afecten la expresión y los fenotipos de los antígenos de grupos sanguíneos; por su parte, el análisis no monitorea explícitamente los cambios de nucleótidos asociados con estos eventos. Entre los ejemplos se encuentran variaciones en la secuencia de ADN, incluidos los codones de terminación prematuros, polimorfismo de un único nucleótido (SNP) que origina un cambio de sentido en el aminoácido, genes híbridos, modificación de genes, cambios en el nivel de transcripción del ARN como el empalme alternativo, expresión reducida de proteína, etc. Los fenotipos conocidos son Knull, JKnull (JKnull tiene una prevalencia de hasta 9 % entre los polinesios[21]), Rhnull, híbridos Rh, Kmod, Co(a-,b-), In(Lu), Lu(a-,b-) e híbridos GP. La presencia de una mutación c.179_180del (Ser60fs) asociada con el alelo Fy(b) puede cambiar la expresión del antígeno Fy(b) y ser la causa de un resultado de falso positivo.
- El software BASIS no está diseñado para convertir todas las combinaciones de genotipos/alelos en fenotipados. Por ejemplo, si se encuentran combinaciones de alelos que no cuentan con una bibliografía extensa, el software presentará un resultado de Variante posible (PV).
- Los análisis HEA se sustentan en mutaciones de dos puntos para predecir los fenotipos de antígenos V y VS: 733C>G(L245V) en el Exón 5 y 1006G>T(G336C) en el Exón 7 del gen RHCE
- Las normas para la conversión de la predicción genotipo a fenotipo que utiliza el análisis HEA se basan en el hecho demostrado de que la ausencia de las dos mutaciones tiene correlación con la ausencia de los antígenos V y VS, al igual de que la presencia de las mutaciones es causa de la expresión del antígeno.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Seco de venta

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
Página 134 de 174

- BioArray Solutions tiene en cuenta la bibliografía [15] que señala ciertas combinaciones de genotipos (que comprenden las dos mutaciones de interés) que no generan un único fenotipo. Esta limitación solo afecta la caracterización V(+)VS(+). En conformidad con la publicación [15], en una pequeña fracción de los casos, el análisis HEA arrojaría un informe de las muestras como falso positivo en relación con la serología al momento de dar la caracterización V(+)VS(+) (4,2 % para VS y 1,4 % para V). La caracterización V(-)VS(-) no se ve afectada.

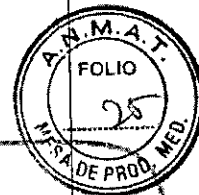
- En el análisis HEA, la presencia/ausencia del antígeno RhC se informa según tres polimorfismos 307C>T(P103S) en el Exón 2, 733C>G (L245V) en el Exón 5, 1006G>T (G336C) en el Exón 7 y la presencia/ausencia del inserto 109 bp en el Intrón 2 del gen RHCE.

La caracterización (+)* del antígeno RHC implica la posible presencia del antígeno C alterado codificado por el haplotipo (C)ce^s. El haplotipo (C)ce^s comprende:

- i) Un alelo RHD-CE-D híbrido del gen RHD, y
- ii) alelo ce^s del gen RHCE

El haplotipo (C)ce^s produce C débil, c normal, e débil (también conocido como e^s) y VS (RH20)[16].

- El antígeno U (que se encuentra en la proteína GPB) no es polimórfico por sí mismo. La expresión del antígeno U está regida por los cambios que afectan la expresión de los antígenos S. Específicamente, se sabe que el fenotipo S-s- está asociado con la ausencia o con la expresión débil del antígeno U. El análisis HEA monitorea tres mutaciones que conforman el fenotipo S-s- y puede caracterizar el fenotipo U(var) y U(neg). Ocasionalmente, puede no ser posible arribar a una caracterización de fenotipo U(neg), aun cuando la caracterización de fenotipo sea S-s- a causa de intensidades residuales no específicas en las sondas que rigen el silenciamiento del antígeno S/s.
- El alelo Fyx codifica un cambio de aminoácido que origina el fenotipo Fy(b+w) con diversos grados de antígeno debilitado Fyb. Es posible que los reactivos anti-Fyb serológicos autorizados no siempre reaccionen con un antígeno Fyb de tal modo debilitado [18].
- El quimerismo mixto en pacientes de trasplante de células madre hematopoyéticas podría generar resultados IC en el análisis.[23]



X. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

A. Estudio de exactitud

BioArray llevó adelante un estudio para demostrar que el Ensayo HEA PreciseType puede identificar con exactitud los fenotipos enumerados con el uso de muestras preseleccionadas y bien caracterizadas. Los fenotipos de antígenos de glóbulos rojos (RBC) se determinaron con dos métodos. Los antígenos RBC caracterizados mediante serología (antisueros autorizados) incluyen D_i^a , Fy^a , Fy^b , M, N, S, s, JK^a , JK^b , Kp^a , Kp^b , Lu^b , C, c, E, e, K y k (U se infiere a partir del tipaje S/s). Entre los antígenos de glóbulos rojos que se caracterizaron con secuenciación bidireccional (no se dispone de los correspondientes antisueros autorizados) se incluyen Co^a , Co^b , Di^b , Js^a , Js^b , Lu^a , LW^a , LW^b , V, VS, Sc1, Sc2, Do^a , Do^b , Jo^a y Hy (también se incluye HbS). Se seleccionaron muestras para lograr diversidad fenotípica a fin de cubrir todos los estatus de antígenos positivos y todos los estatus de antígenos negativos, a excepción de tres (Di^b , LW^a y Sc1).

Con el objeto de garantizar la diversidad fenotípica, en el criterio de exactitud se incluyeron datos combinados (muestras válidas únicas) provenientes de tres estudios diferentes: un estudio de detección de genotipos, el estudio clínico descrito infra y la evaluación de desempeño llevada adelante en Europa. Algunas muestras o de algunos resultados de muestras que se recolectaron de fuentes históricas no estuvieron disponibles para someterlos a pruebas subsiguientes para la resolución de discrepancias.

A fin de aceptarlos, todos los fenotipos debían alcanzar o exceder el 99 % en el límite inferior del intervalo unilateral de confianza de 95 % para exactitud (definida como acuerdo global con el método de comparación). Todos los antígenos alcanzaron los criterios de aceptación, a excepción de Lu^b y V, que presentaron límites inferiores de 98,46 % en el caso de Lu^b y 98,92 % en el caso de V. En pruebas subsiguientes se demostró una concordancia completa para V en PreciseType, comparado con la secuenciación bidireccional. No se disponía de análisis subsiguientes en el caso de Lu^b ; la discrepancia exhibida en Lu^b entre PreciseType y serología puede deberse a $In(Lu)$ o $Lu(a-b-)$, según se describe en la sección de Limitaciones del procedimiento.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. FEINOSO
Socio Gerente

31

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
Página 39 de 174

Tabla 11: Resultados del estudio de exactitud PreciseType

Antígeno	Muestras	Caracterización correcta de porcentaje	Limite inferior de confianza de 95 %
c	1147	99,91 %	99,59 %
C	1146	100 %	99,74 %
e	1383	100 %	99,78 %
E	1383	100 %	99,78 %
K	1149	100 %	99,74 %
k	909	99,89 %	99,48 %
Kpa	657	100 %	99,55 %
Kpb	875	100 %	99,66 %
Jsa	1158	100 %	99,74 %
Jsb	1345	100 %	99,78 %
Jka	1124	100 %	99,73 %
Jkb	1123	99,91 %	99,58 %
Fya	1131	99,73 %	99,32 %
Fyb	1130	99,82 %	99,44 %
M	1053	100 %	99,72 %
N	1052	99,81 %	99,40 %
S	1126	99,91 %	99,58 %
s	1126	100 %	99,73 %
Lua	1223	99,75 %	99,37 %
Lub	1414	99,01 %	98,46 %
Dia	820	100 %	99,64 %
Dib	820	100 %	99,64 %
Coa	1378	99,93 %	99,66 %
Cob	972	100 %	99,69 %
Doa	980	100 %	99,69 %
Dob	979	100 %	99,69 %
Joa	650	100 %	99,54 %
Hy	650	100 %	99,54 %
LWa	625	100 %	99,52 %
LWb	625	100 %	99,52 %
Sc1	627	100 %	99,52 %
Sc2	957	100 %	99,69 %
HbS	686	100 %	99,56 %
VS	649	100 %	99,54 %
V	843	99,53 %	98,92 %
U	309	100 %	99,04 %



B. Acuerdo Clínico Global, Positivo y Negativo, según comparación con concordancia clínica y de serología, Sensibilidad y Especificidad según comparación con secuenciación de ADN

Entre 2011 y 2013, cuatro laboratorios estadounidenses llevaron adelante un estudio denominado "Evaluación del kit HEA BeadChip comparado con los métodos establecidos para la determinación de antígenos eritrocitarios humanos". En este estudio se compararon los resultados de tipaje del análisis PreciseType HEA BeadChip con las metodologías serológica y de secuenciación de ADN. Se sometieron a prueba un total de 1777 muestras, de las cuales 1757 podrían usarse para fines comparativos, con 1684 resultados válidos del análisis HEA BeadChip, lo que arroja una tasa de validez del 95,85 % (1684/1757). De los 1684 resultados válidos, 1248 resultados comparativos válidos conjugados por fenotipo se consideraron para análisis (SC1 y SC2 tienen 1247 resultados comparativos válidos). Las muestras se seleccionaron aleatoriamente, con lo que se abarcaron todos los estados de antígenos positivos y todos los estados de antígenos negativos a excepción de seis (k, Kp^b, Di^b, Co^a, LW^a y SC1 negativo).

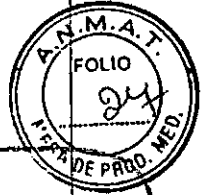
Los antígenos RBC caracterizados mediante serología (antisueros autorizados) incluyen Di^a, Fy^a, Fy^b, M, N, S, s, Jk^a, Jk^b, Kp^a, Kp^b, Lu^b, C, c, E, e, K y k (U se infiere a partir del tipaje S/s). Entre los antígenos RBC caracterizados con secuenciación bidireccional (no se dispone de los correspondientes antisueros autorizados) se incluyen Co^a, Co^b, Di^b, Js^a, Js^b, Lu^a, LW^a, LW^b, V, VS, Sc1, Sc2, Do^a, Do^b, Jo^a y Hy (también se incluye HbS).

La Tabla 12 enumera todos los antígenos que se sometieron a prueba con los métodos serológico y de secuenciación. Para los 18 antígenos que se evaluaron con métodos serológicos, el Acuerdo porcentual global osciló entre el 95,99 % y el 100,00 %, el Acuerdo porcentual positivo osciló entre el 98,77 % y el 100,00 %, mientras que el Acuerdo porcentual negativo osciló entre el 71,43 % y el 100,00 %. Para los 21 antígenos sometidos a prueba con métodos de secuenciación de ADN, la Concordancia osciló entre el 99,76 % y el 100,00 %, la Sensibilidad porcentual osciló entre el 98,67 % y el 100,00 %, mientras que la Especificidad porcentual fue del 100,00 %.

Análisis molecular PreciseType HEA BeadChip | 190-20210-LA Rev. C | Octubre de 2016

Tabla 12: Ensayo PreciseType comparado con serología y secuenciación

Antígeno	Comparado con serología			Comparado con secuenciación		
	Muestras	porcentual global Acuerdo	inferior 95 % Límite de confianza	Muestras	Concordancia	inferior 95 % Límite de confianza
c	1248	100,00 %	99,76 %	N/A	N/A	N/A
C	1248	98,48 %	97,77 %	N/A	N/A	N/A
e	1248	100,00 %	99,76 %	N/A	N/A	N/A
E	1248	99,84 %	99,50 %	N/A	N/A	N/A
K	1248	100,00 %	99,76 %	N/A	N/A	N/A
k	1248	100,00 %	99,76 %	N/A	N/A	N/A
Kpa	1248	100,00 %	99,76 %	N/A	N/A	N/A
Kpb	1218	100,00 %	99,75 %	N/A	N/A	N/A
Jsa	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
Jsb	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
Jka	1248	98,64 %	97,96 %	N/A	N/A	N/A
Jkb	1248	98,48 %	97,77 %	N/A	N/A	N/A
Fya	1248	99,84 %	99,50 %	N/A	N/A	N/A
Fyb	1248	98,32 %	97,59 %	N/A	N/A	N/A
M	1248	99,12 %	98,55 %	N/A	N/A	N/A
N	1248	95,99 %	94,96 %	N/A	N/A	N/A
S	1248	99,92 %	99,62 %	N/A	N/A	N/A
s	1248	99,84 %	99,50 %	N/A	N/A	N/A
Lua	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
Lúb	663	99,85 %	99,29 %	N/A	N/A	N/A
Dia	1248	99,92 %	99,62 %	N/A	N/A	N/A
Dib	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
Coa	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
Cob	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
Doa	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
Dob	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
Joa	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
Hy	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
LWa	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
LWb	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
Sc1	N/A	N/A	N/A	1247	100,00 %	99,76 %
Sc2	N/A	N/A	N/A	1247	100,00 %	99,76 %
HbS	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
VS	N/A	N/A	N/A	1248	100,00 %	99,76 %
V	N/A	N/A	N/A	1248	99,76 %	99,38 %
U	1248	99,84 %	99,50 %	N/A	N/A	N/A



C. Acuerdo global del análisis HEA BeadChip con resolución post-discordante mediante serología y secuenciación

En el mismo estudio mencionado en la sección anterior, todas las discrepancias observadas se resolvieron mediante el análisis de la secuencia de ADN. La secuenciación bidireccional se considera como un "estándar de excelencia": el método de referencia para el análisis de secuenciación. El término "método de referencia" alude a un procedimiento analítico con validación sólida, suficientemente libre de error sistémico o aleatorio, de modo que resulte útil para validar nuevos procedimientos analíticos propuestos para el mismo analito [22].

Antígeno	Cantidad de muestras discordantes (De un total de 1248)	Concordante según PreciseType con el método de referencia (Secuenciación bidireccional)
Jkb	19	12 de 19
Fyb	21	20 de 21
C	19	19 de 19
Jka	17	17 de 17
M	11	11 de 11
N	50	50 de 50
Fya	2	2 de 2
E	2	2 de 2
S	1	1 de 1
s	2	2 de 2
Lub	1 (663)	1 de 1
Dia	1	1 de 1
V	3	3 de 3

- Muestras discordantes para Jkb con serología:
 - Hubo 19 muestras discordantes; todas ellas fueron positivas por PreciseType y negativas por serología.
 - Doce muestras fueron concordantes entre PreciseType y la secuenciación bidireccional.
 - En siete muestras no hubo acuerdo con serología ni con secuenciación bidireccional y se identificaron como ^{mutas} para Jk (véase la sección de Limitaciones del procedimiento).
- Muestras discordantes para Fyb con serología:
 - Hubo 21 muestras discordantes; 20 de ellas fueron concordantes entre PreciseType y secuenciación
 - Quince resultaron positivas para PreciseType, negativas para serología, mientras que 14 fueron concordantes entre PreciseType y la secuenciación bidireccional (todas presentaron Fyb débil).
 - Una muestra fue discordante entre PreciseType y la secuenciación bidireccional y, tras profundizar la investigación, se concluyó que se trataba de una mutación nueva que aún no estaba caracterizada en la bibliografía (véase la sección de Limitaciones del procedimiento).
- Muestras discordantes para C con serología:
 - Hubo 19 muestras discordantes: todas fueron positivas para PreciseType, negativas para serología; todos los resultados de PreciseType fueron concordantes con la secuenciación bidireccional.
- Muestras discordantes para Jka con serología:
 - Hubo 17 muestras discordantes; todos los resultados PreciseType fueron concordantes con la secuenciación bidireccional.
- Muestras discordantes para M con serología:
 - Hubo 11 muestras discordantes; todos los resultados PreciseType fueron concordantes con la secuenciación bidireccional.
- Muestras discordantes para N con serología:
 - Hubo 50 muestras discordantes; todos los resultados PreciseType fueron concordantes con la secuenciación bidireccional.
- Todas las demás discrepancias (Fya, E, S, s, Lub, Dia y V)
 - Se concluyó que todas las demás discrepancias de otros antígenos estaban en concordancia con la secuenciación bidireccional.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Corrente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
M.N. 12.855
Página 43 de 174

D. Repetibilidad y reproducibilidad

El objetivo de estos estudios fue demostrar que el análisis PreciseType HEA genera resultados reproducibles y repetibles con un panel de muestras de ADN humano en los diversos centros y operadores en el transcurso de cinco días. Los estudios se realizaron tanto con portaobjetos de ocho chips como con la placa para 96 chips.

Fueron seis los operadores de tres centros que participaron en el estudio con el portaobjetos. Fueron ocho los operadores de cuatro centros que participaron en el estudio con la placa. Antes de iniciar el estudio se completó una capacitación documentada, incluida una evaluación de competencias. El panel constó de 11 muestras previamente caracterizadas de ADN (secuenciación bidireccional) extraídas de líneas celulares inmortalizadas derivadas de sangre humana total que representa todos los fenotipos positivos en PreciseType. En el panel también se evaluaron 24 fenotipos negativos; hubo 12 fenotipos negativos que no se evaluaron (e, k, Kp^b, Js^b, U, Lu^b, Di^b, Co^a, Joa, Hy, LW^a y SC1).

Si se determinaba que alguna de las tandas del análisis era inválida, se la repetía, (es decir, error del operador, falla evidente del equipo o un control negativo o positivo que no fuera válido).

Las muestras con resultados inválidos (fondo alto, baja señal, caracterización indeterminada, alto coeficiente de variación) se categorizaron como sin determinación de tipo (NTD) y no se las incluyó en los cálculos debido a la logística del estudio; sin embargo, se capturó la tasa de incidencia (portaobjetos: tasa del 0,3 % de muestras inválidas; placa: tasa de 0,8 % de muestras inválidas).

Resultados de repetibilidad: Tanto para el formato de portaobjetos como para el formato de la placa, los resultados arrojaron un acuerdo de 100 %, mientras que los estudios reflejaron una repetibilidad del 100 %.

Repetibilidad (concordancia porcentual)	Total
Dentro de cada centro	100 %
Dentro de cada operador	100 %
Dentro de cada día	100 %
Dentro de cada muestra	100 %

Resultados de reproducibilidad: Tanto para el formato de la placa como para el formato de portaobjetos, los resultados reflejaron un 100 % de reproducibilidad.

Reproducibilidad (porcentual)	Total
Entre centros	100 %
Entre operadores	100 %
Entre días	100 %



Resultados de reproducibilidad entre lote y lote: Se llevó adelante un estudio separado entre lote y lote sobre un panel íntegramente caracterizado (n=22) de muestras de ADN genómico humano extraído; en dicho estudio, el análisis PreciseType HEA se llevó a cabo con kits de tres lotes diferentes para demostrar la reproducibilidad entre lotes. Se realizó el enmascaramiento de estas 22 muestras con respecto al operador para eliminar cualquier sesgo y se las seleccionó de modo que representaran los rangos más amplios posibles de alelos que se contienen en el análisis de PreciseType. El mismo operador repitió los mismos análisis durante cinco días separados para demostrar la repetibilidad. Los resultados arrojaron un acuerdo de 100 % y el estudio refleja repetibilidad y reproducibilidad de 100 % entre lotes.

Reproducibilidad (porcentual)	Total
Entre lotes	100 %
Entre días	100 %

Conclusión general: Al considerar los antígenos, todos los resultados de muestras (en la totalidad de las muestras) presentaban acuerdo con los resultados esperados dentro de cada operador, entre días, en todos los operadores y en todos los centros. Por ende, podemos concluir que el análisis PreciseType HEA es 100 % repetible y 100 % reproducible.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
Página 45 de 155

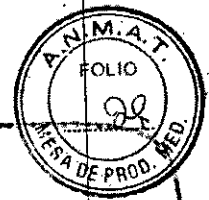
E. Sustancias interferentes

Se determinó que las siguientes sustancias, que se encuentran comúnmente en la piel y en la sangre, no interfieren con el análisis PreciseType HEA.

Microorganismos: Los siguientes organismos se sometieron a análisis a 10^6 UFC por mL de sangre; *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheria* y *jeikeium*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus epidermidis*, *haemolyticus* y *aureus*, *Streptococcus pneumonia* y *mitis*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*. También se realizaron análisis sobre los niveles citopáticos del virus de influenza sin que se observara interferencia.

Sustancias exógenas: amoxicilina ($2,06E+02$ $\mu\text{mol/L}$), sal potásica de penicilina G ($2,73$ $\mu\text{g/mL}$), hidroxiurea ($3,50$ $\mu\text{g/mL}$), acetaminofeno ($1,32E$ $\mu\text{mol/L}$), ibuprofeno ($2,43$ $\mu\text{mol/L}$), aspirina ($3,62E$ $\mu\text{mol/L}$), naproxeno ($2,17E$ $\mu\text{mol/L}$), plavix ($3,00E$ $\mu\text{mol/L}$), warfarina ($3,25E$ $\mu\text{mol/L}$), loratadina ($7,80E$ $\mu\text{mol/L}$), atorvastatina (Lipitor) ($5,48E+2$ $\mu\text{mol/L}$), clorhidrato de fenilefrina ($4,91E$ $\mu\text{mol/L}$), nadolol ($3,88E$ $\mu\text{mol/L}$), ácido fólico (Vit. B) ($1,50E+1$ $\mu\text{mol/L}$), ácido ascórbico (Vit. C) ($3,42E$ $\mu\text{mol/L}$)

Sustancias endógenas: Valores patológicos de hemoglobina (hasta 500 g/L), bilirrubina (hasta 67 mg/dL), triglicéridos (hasta 1000 mg/dL) y proteína total (hasta 90 g/L)



XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Klein HG, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 11^a ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005.
2. Reid ME. Applications of DNA based assays in blood group antigen and antibody identification. Transfusion. Diciembre de 2003; 43(12):1748-57.
3. Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajhala P, HueRoya K. A flexible array format for large scale, rapid blood group DNA typing. Transfusion. Mayo de 2005; 45(5):680-8.
4. Wagner T, Resch B, Reiterer F, Gassner C, Lanzer G. Pancytopenia due to suppressed hematopoiesis in a case of fatal hemolytic disease of the newborn associated with anti-K supported by molecular K1 typing. J Pediatr Hematol Oncol. Enero de 2004; 26(1):13-5.
5. Eder AF. Update on HDFN: new information on long-standing controversies. Immunohematology. 2006; 22(4):188-95.
6. Reid ME, Lomas-Francis C. The Blood Group Antigen Facts Book. San Diego: Academic Press; 2003.
7. Blumenfeld OO, Patnaik SK. Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Database. Human Mutation. Enero de 2004; 23(1):8-16.
8. Illoh, Orijei Blood Product Advisory Committee March 18, 2014 Evaluation of the Safety and Effectiveness of the Immucor PreciseType Human Erythrocyte Antigen (HEA) Molecular BeadChip Test: Introduction.
9. ISBT Working Party. Names for FY (ISBT 008) Blood Group Alleles. [Internet]. [citado 27/05/2012]. Disponible en: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/008_FY_Alleles_v2.0_110914.pdf.
10. García ME, Blanco JL, Caballero J, Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. Abril de 2002; 40(4):1567-8.
11. Rios M, Hue-Roya K, Øyen R, Miller J, Reid ME. Insights into the Holley- and Joseph- phenotypes. Transfusion. Enero de 2002; 42(1):52-8.
12. Scofield TL, Miller JP, Storry JR, Rios M, Reid ME. Evidence that Hy- RBCs express weak Joa antigen. Transfusion. Febrero de 2004; 44(2):170-2.
13. Noizat-Pirenne F, Mouro I, Le Pennec PY, Ansart-Pirenne H, Juszcak G, Patereau C, Verdier M, Babinet J, Roussel M, Rouger P, et al. Two new alleles of the RHCE gene in Black individuals: the RHce allele ceMO and the RHce allele cEM1. Br J Haematol. Junio de 2001; 113(3):672-9.
14. Noizat-Pirenne F, Lee K, Pennec PY, Simon P, Kazup P, Bachir D, Rouzaud AM, Roussel M, Juszcak G, Ménanteau C, et al. Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety. Blood. 1.º de diciembre de 2002; 100(12):4223-31.
15. Daniels GL, Faas BH, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, Zondervan HA, von dem Borne AE, van der Schoot CE. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. Transfusion. Octubre de 1998; 38(10):951-8.
16. Pham BN, Peyrard T, Juszcak G, Dubeaux I, Gien D, Blancher A, Cartron JP, Rouger P, Le Pennec PY. Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hr B-, Hr B- phenotype in black persons. Transfusion. Marzo de 2009; 49(3):495-504.
17. Westhoff CM, Vege S, Copeland T, Baker E, Velliquette R, Lomas-Francis C. A new glycoprotein B allele, GYPB (IVS5+3G>A), in trans to GYPB (IVS5+5G>T) is associated with discrepant prediction of S and U antigen status. Vox Sanguinis. 2012; 103 (Suppl. 1), 212.
18. Blood Grouping Reagent Anti-Fya Anti-Fyb. By indirect antiglobulin test [package insert]. Norcross, GA: Immucor, Inc.; 2007
19. Westhoff CM, Vege S, Horn T, Hue-Roya K, Halter Hipsky C, Lomas-Francis C, and Reid ME. RHCE*ceMO is frequently in cis to RHD*DAU0 and encodes a hrs-, hrB-, RH:61 phenotype in black persons: clinical significance. Transfusion. Noviembre de 2013; 53(11):2983-2989
20. Wang Y, Beckwith B, Smith C, Horowitz G. Misleading glycated hemoglobin results in a patient with hemoglobin SC disease. Clinical Chemistry. 2007. 53(7):1394-5.
21. Lin M, Yu LC. Frequencies of the JKnull (IVS5-1g>a) allele in Taiwanese, Fujian, Filipino, and Indonesian populations. Transfusion. Agosto de 2008; 48(8):1768.
22. Guidance for Industry and FDA Staff: Pharmacogenetic Tests and Genetic Tests for Heritable Markers. 19 de junio de 2007.
23. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? Bone Marrow Transplant. Enero de 2005; 35(2):107-19.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136523-APN-DNPM#ANMAT

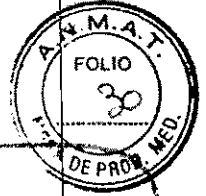
HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
Página 47 de 1742.855

XII. POSIBLES MENSAJES DE ADVERTENCIA CONTENIDOS EN EL INFORME BASIS

PANTALLA	CAUSA	SOLUCIÓN
Ax (Genotipado indeterminado en B)	Indica insuficiencia en la discriminación alélica para el marcador afectado, lo que origina una resolución parcial del genotipo, por lo que no puede realizarse una caracterización definitiva de un alelo (que se representa con la caracterización "x"). Se confirma que la muestra tiene la forma "A" del alelo.	Si el resultado de la muestra es inválido, repita el análisis prestando especial atención al manejo del reactivo y a la técnica del pipeteo.
xB (Genotipado indeterminado en A)	Indica insuficiencia en la discriminación alélica para el marcador afectado, lo que origina una resolución parcial del genotipo, por lo que no puede realizarse una caracterización definitiva de un alelo (que se representa con la caracterización "x"). Se confirma que la muestra tiene la forma "B" del alelo.	Si el mensaje de advertencia continúa apareciendo, comuníquese con el departamento de asistencia técnica o con el distribuidor.
CV (Alto coeficiente de varianza)	Indica que para la muestra afectada la variación en la señal de intensidad medida de las microesferas individuales tiene un valor demasiado alto para ser aceptable.	No se informan resultados.
HB (Fondo alto)	Indica que para la muestra afectada, la intensidad del fondo tiene un valor demasiado alto para ser aceptable.	
IC (Característica indeterminada)	Indica que para el o los antígenos afectados existe discriminación insuficiente entre el o los pares de sondas usados para determinar el fenotipo, o bien que hay un error más alto que el previsible asociado con la proporción de discriminación para el o los pares de sondas usados para determinar el fenotipo.	Repita el análisis prestando especial atención al manejo del reactivo y a la técnica de pipeteo. Si el mensaje de advertencia continúa apareciendo, comuníquese con el departamento de asistencia técnica o con el distribuidor.
LS (Baja señal)	Indica que la intensidad de señal del marcador afectado tiene un valor demasiado bajo para ser aceptable.	
NTD (Sin determinación de tipo)	Indica que no se presentan resultados de tipaje para la muestra a causa de una falla en la muestra o en el criterio de la tanda.	
PV (Variante posible)	Indica que para el o los antígeno/s afectados se detectó un patrón de genotipo para el que no hay un fenotipo establecido. Por lo tanto, los resultados de genotipo no podrían convertirse a un resultado de fenotipo previsto. Posible nueva combinación de alelos.	Se recomienda realizar más análisis para obtener más información sobre la muestra

Para resolución de problemas referidos a Instrumentos AIS, consulte el Manual del Usuario de AIS (190-20185).





Patentes

Todos los bienes y servicios se venden sujetos a los términos y condiciones de venta de BioArray Solutions Ltd. y quedan cubiertos por una o más de las siguientes números de patentes: 6.797.524, 7.427.512, 7.335.153, 7.390.676, EP1311839B1; CA2413978 (patentes adicionales en trámite).

La compra de este producto le garantiza al adquirente, en virtud de determinadas patentes de Roche, el derecho de uso exclusivamente para la provisión de Servicios de Diagnóstico Humano In Vitro. No se garantiza ninguna patente general ni ninguna otra licencia de ningún tipo más que este derecho específico de uso derivado de la compra.

Este producto y su uso quedan cubiertos por una o más de las siguientes patentes: EP 0 820 524, EE. UU. 6.150.095, 6.307.039, 6.770.751 y 7.192.707, Jap 2006 246897 y patentes en trámite. El comprador queda autorizado a proceder a la práctica de métodos y procesos abarcados por estas patentes usando este producto únicamente para la finalidad de la inmunohematología molecular.

La polimerasa de ADN Thermo Sequenase® contenida en este producto queda abarcada por la patente de Estados Unidos 5.614.365 y equivalentes extranjeros de propiedad de Harvard College y su licencia exclusiva otorgada a GE HEALTHCARE, al igual que por la patente de Estados Unidos 5.885.813 y equivalentes extranjeros de propiedad de GE HEALTHCARE.

Marcas comerciales

PreciseType, BeadChip, AIS, BASIS y eMAP son marcas comerciales y, por su parte, BeadCheck es una marca comercial registrada de BioArray Solutions Ltd.

HotStarTaq, QIAcube y QIAamp son marcas comerciales registradas de QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania, cuya licencia se otorgó a BioArray Solutions.

Veriti y GeneAmp son marcas comerciales registradas de Life Technologies Corporation.

DNA AWAY es una marca comercial de Molecular BioProducts, Inc.

InSlide Out es una marca comercial registrada de Boekel Scientific

MiniMouse II es una marca comercial de Denville Scientific Inc.

MicroAmp es una marca comercial registrada de Applied Biosystems

Excel es una marca comercial registrada de Microsoft Corporation

Thermo Sequenase es una marca comercial registrada de GE Healthcare UK Limited

Los nombres registrados, marcas comerciales, etc., usados en este documento, aun cuando no se los indicara de tal modo, habrán de considerarse amparados por la ley.



Fabricante:

BioArray Solutions Ltd.
35 Technology Drive, Suite 100
Warren, NJ 07059 EE. UU.
Línea gratuita (+1) 866 566-8200
Fax (+1) 908 226-0800
<http://www.immucor.com>

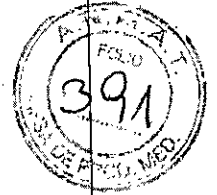
Para comunicarse con un representante del departamento de asistencia técnica de Immucor, llame al 855.IMMUCOR (855.466.8267), opción 2, o bien envíe un correo electrónico a: BASTechSupport@Immucor.com

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAULAY LUCCHINI
Directora Técnica
M.N. 12.855
Página 49 de 174



IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT



Sobre el Sistema Array

Indicación de Uso

El Sistema de Imágenes de Array BioArray Solutions (AIS), AIS 400, es un sistema de adquisición de imágenes automatizado diseñado para su uso con los kits BeadChip de BioArray Solutions.

Modelos

AIS 400C

AIS 400D

Resultados esperados

Las características de rendimiento específicas y la frecuencia esperada de los posibles resultados del ensayo se describen en las instrucciones de uso de los reactivos. Los resultados esperados son específicos para los reactivos en uso. Consulte las las instrucciones de uso de los reactivos para obtener descripciones de los resultados esperados para los reactivos y los pocillos de prueba.

Se recomienda la configuración de hardware y software AIS de Immucor para ver, informar y analizar los resultados de BeadChip Molecular Precise Type de Immucor. Se puede utilizar otro hardware y / o software compatible; sin embargo, se requiere una validación por separado y los resultados no se pueden garantizar.

Información General

El AIS 400 está destinado exclusivamente para uso profesional. Este producto está destinado a ser utilizado en diagnóstico in vitro.

Para evitar una descarga eléctrica, el sistema solo debe conectarse a fuentes de alimentación con conexión a tierra. Los cables de alimentación del sistema están equipados con enchufes que ayudan a garantizar una conexión a tierra adecuada. No use enchufes adaptadores ni quite la clavija de conexión a tierra de los cables de alimentación. Si debe usar un cable de extensión, use un cable de 3 hilos con un enchufe con la toma de tierra adecuada de un calibre suficiente.

Utilice el supresor de tensión / acondicionador de línea provisto por BioArray Solutions.

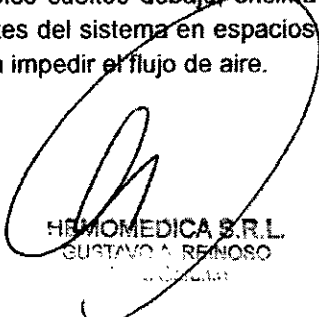
Asegúrese de que nada se apoye en los cables del sistema, y que los cables no estén ubicados donde puedan pisarse o tropezarse.

No permita que se derrame comida o bebida en partes del sistema. Si alguna parte del sistema se moja, apáguelo inmediatamente y comuníquese con la Organización de Soporte Técnico de BioArray Solutions.

No introduzca ningún objeto en las aberturas del sistema. Si lo hace, puede provocar un incendio, una descarga eléctrica o daños internos en los circuitos.

Mantenga el sistema libre de fuentes de calor, como radiadores. No bloquee las aberturas de ventilación. Evite colocar papeles sueltos debajo, encima o apoyados contra cualquier lado del sistema. No instale componentes del sistema en espacios cerrados, como estanterías modulares o muebles en los que se pueda impedir el flujo de aire.

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REMOSO
DIRECCIÓN

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAOLA ZUCCHINI
DIRECCIÓN TÉCNICA
C.N. 126974

392

Este producto está clasificado como IPX0. El instrumento está clasificado para 100-240Vac, 50-60Hz, 3ª.

AIS 400 Hardware

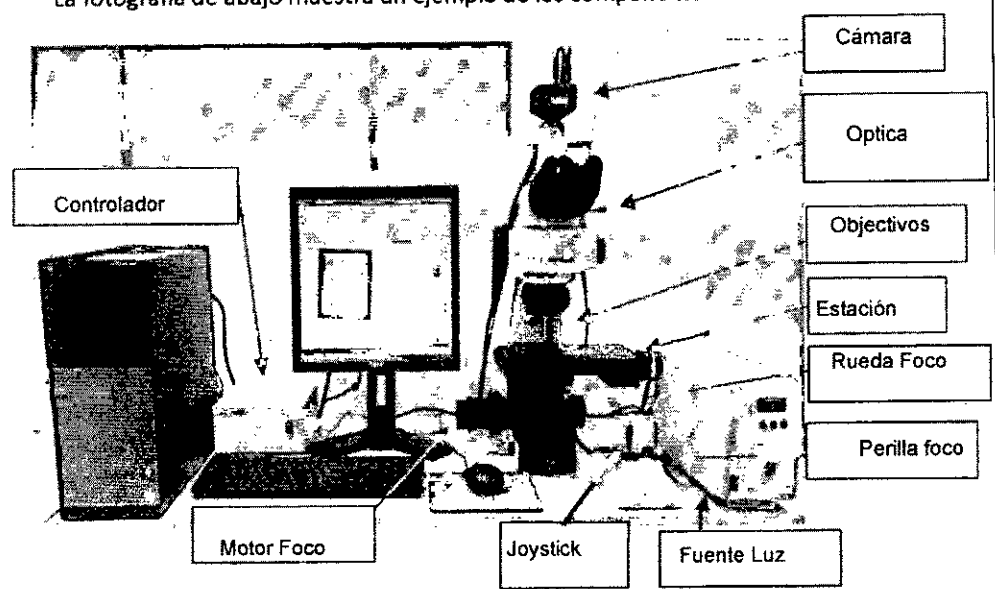
Visión general

El AIS 400 incluye un microscopio, una caja de control PRIOR OptiScan con platina automática, motor de enfoque y rueda de filtro, fuente de luz, cámara CCD, computadora y un paquete de software que incluye el Lector del Sistema de Imágenes de Array (AISR).

Los componentes de hardware adquieren las imágenes necesarias para analizar los arreglos BeadChip. El programa AISR controla el funcionamiento del microscopio, incluido el tiempo de exposición, el posicionamiento automático y el enfoque automático. Transferencia de imágenes adquiridas al Sistema de Información de Soluciones BioArray (BASIS).

Sistema ARRAY

La fotografía de abajo muestra un ejemplo de los componentes del sistema



[Handwritten Signature]
HEMOMEDICA S. R. L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S. R. L.
BAJILA ZUCCHINI
Buenos Aires, Argentina
C.I.B. 2018-774

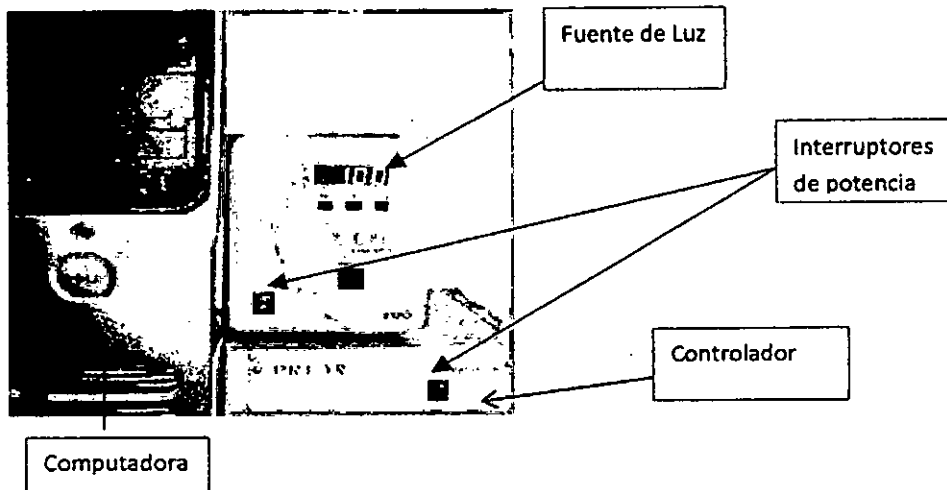


Componentes

- Cámara CCD
- Joystick
- Filtros: hay dos filtros: uno utilizado para enfocar y centrar el otro para obtener imágenes fluorescentes. Se seleccionan automáticamente.
- Microscopio
- Objetivos 4X y 20X.
- Escáner de código de barras
- Computadora
- Cables de poder
- Tira de alimentación filtrada
- Controlador
- Fuente de luz

Fuente de luz X-CITE, computadora y de controlador PRIOR

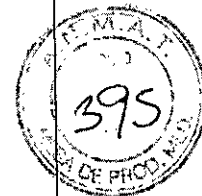
La fotografía de abajo muestra un ejemplo de la fuente de luz X-CITE, la computadora y el controlador.



190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso

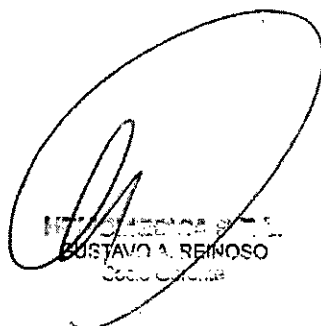

HEMO MEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMO MEDICA S.R.L.
PAOLA ZUCCHINI
Departamento Técnico
C.I.N. 100474



Requisitos del sistema

Hardware	
Procesador	Intel Core i3-2120 Procesador, 3.3 GHz (AIS 400C only) Intel Core i5-4570S Procesador, 2.90 GHz (AIS 400D only)
RAM	2 GB RAM (AIS 400C only) 8 GB RAM (AIS 400D only)
Unidad óptica	CD-RW
Sistema operativo	
Sistema operativo	Windows XP with Service Pack 2 (AIS 400C only) Windows 7 64-bit (AIS 400D only)
Software	
Control Software	AISR
Antivirus	Symantec Endpoint
Utilities	Acrobat Reader, Microsoft Excel, Internet Explorer
Ambiente	
Temperatura	60°F (15°C) a 80°F (26.7°C) cuando está en uso
Humedad	20% a 80%
Altitud	6562 ft (2000 m) máxima
Luz ambiental	Evite la exposición del instrumento a la luz solar directa, ya que puede reducir el rango de rendimiento del instrumento.
Espacio y ubicación	4' w X 2.5' d X 2.5' h (1.22m w X 0.76m d X 0.76m h) El sistema debe estar ubicado en un banco o mesa de laboratorio.
Superficie	Capaz de soportar 100 lbs. (46 Kg)
Suministro de línea	100-240Vac, 50-60Hz, 3A salida a tierra máxima


GUSTAVO A. BENOSO
C.C.O. 12.674

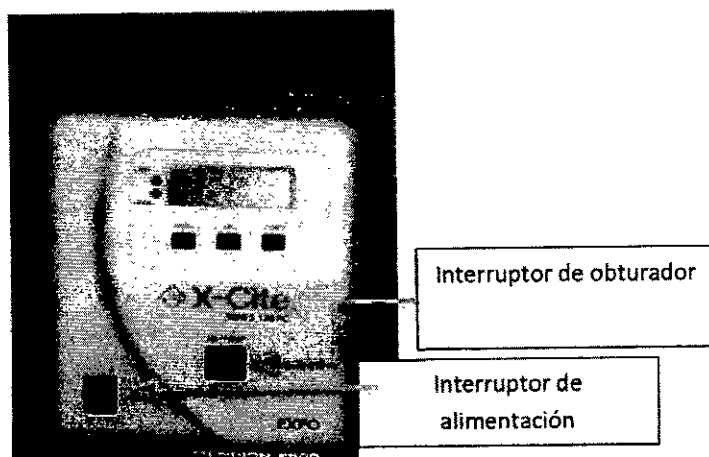
190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PARADIA ZUCCHINI
Calle 547
B.N. 12.674



Operación del sistema

Fotografía de fuente de luz X-CITE





Encendido y apagado del sistema

PASO	ACCION
1	Presione el botón de encendido en el panel frontal para encender la computadora.
2	Encienda el interruptor de alimentación de la fuente de luz X-CITE ubicado en el panel frontal en la posición (I). Espere hasta que la luz de la pantalla deje de parpadear (aproximadamente 2 minutos).
3	Inicie el programa AISR haciendo doble clic en el icono AISR en el escritorio.
4	Cuando termine de usar el sistema durante el día, haga clic en el menú "Inicio" y apague la computadora seleccionando "Apagar".
5	Gire el interruptor de alimentación de la fuente de luz X-CITE a la posición de apagado (O).

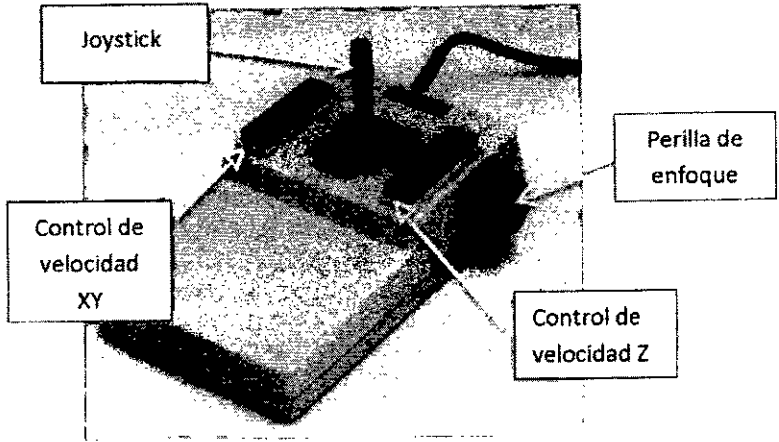
190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso

HEMOMEDICA S.F.L.
GUSTAVO P. REINOSO


IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
RAMA ZUCCHINI
Estrada 5 de Abril
C.P. 11100
Buenos Aires, Argentina

	<p>PRECAUCIÓN: encender y apagar la fuente de luz repetidamente durante el día Acorta significativamente la vida útil de la bombilla. Si el sistema se volverá a utilizar durante el día, deje la fuente de luz encendida.</p>
	<p>PRECAUCIÓN: No apague la fuente de luz dentro de los 30 minutos después de encenderla.</p>

Fotografía del Joystick



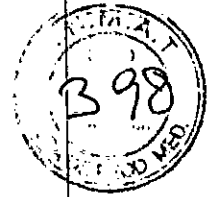
Uso del joystick

PASO	ACCION
1	Para mover el escenario en la dirección x, (de izquierda a derecha), mueva el joystick hacia la izquierda o hacia la derecha.
2	Para mover el escenario en la dirección y, (de atrás hacia delante) mueva el joystick hacia atrás o hacia adelante.
3	Para mover el escenario en la dirección z, (enfoco) gire la perilla de enfoque en el lado derecho del controlador de joystick hacia la derecha (abajo) o hacia la izquierda (arriba).
	<p>PRECAUCIÓN: El control de dirección y se invierte, moviendo el joystick hacia atrás se mueve el escenario al frente.</p>

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso

[Signature]
HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
 PABLO A. ZUCCHINI
 Pagina 6 de 7
 Fecha 12/05/2019



AIS 400 Software

Transferencia de datos de decodificación

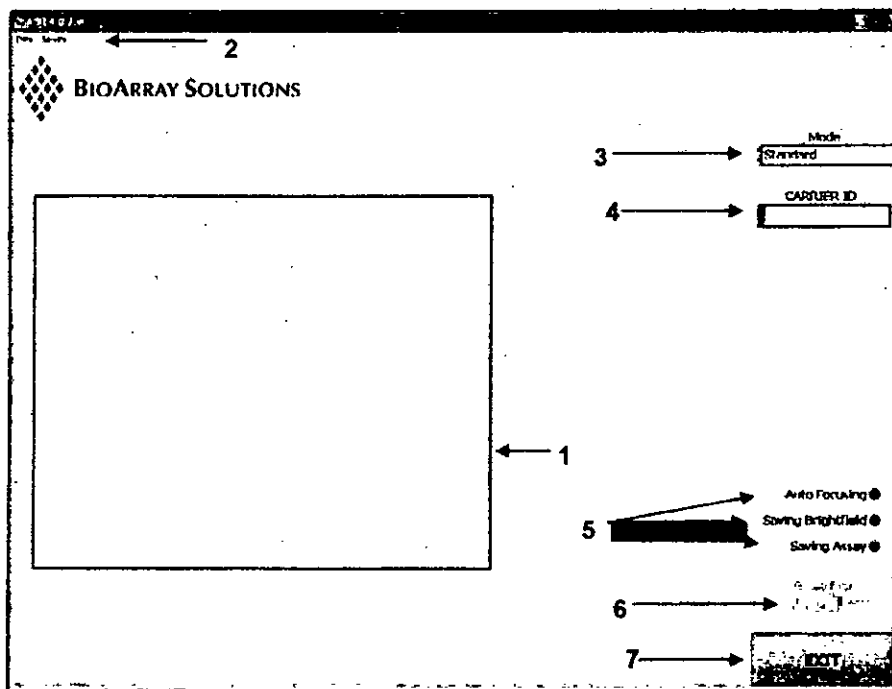
El CD-ROM incluido con los operadores de BeadChip contiene datos de decodificación de clúster y ubicación para el lote específico de operadores de BeadChip. Los datos de decodificación deben cargarse solo una vez por cada lote de BeadChip. Los datos se deben cargar en la computadora antes de que se lean las imágenes de BeadChip.

Adquirir la imagen de BeadChip

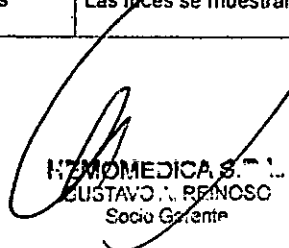
El Array Imaging System Reader (AISR) controla el microscopio y recopila imágenes de la Transportista de BeadChip.

Operación de Array Imaging Software (AISR)

La fotografía de abajo muestra un ejemplo de la pantalla del menú principal de AISR.



Item	Descripción
1. Image Window	Muestra las imágenes de la matriz de BeadChip cuando el selector de ruta óptica está en Posición "Yoto".
2. Menu Bar	Permite el acceso a las funciones de Datos y Servicios.
a. Service	Utilizado solo por el personal de servicio de BioArray Solutions.
b. Data	Se utiliza para transferir datos de decodificación.
3. Mode	Permite al usuario seleccionar el modo Estándar o Reanudar.
4. CARRIER ID	Muestra la ID del CARRIER introducido.
5. Status Indicators	Las luces se muestran para mostrar la operación actual


HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. RINCON
 Socio Gerente

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso
 IF-2019-75136523-APN-DNPM#ANMAT

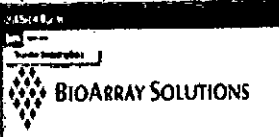
HEMOMEDICA S.R.L.
 PAULA ZUCCHINI
 Pagina 07 de 10
 11/11/2019



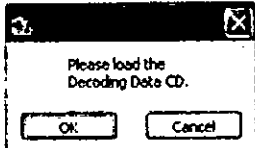
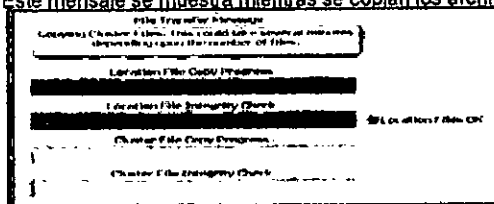
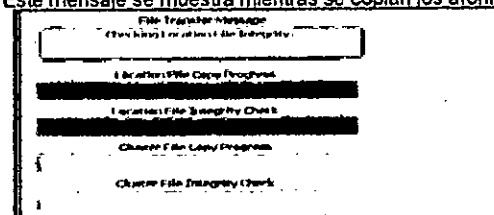
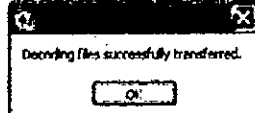
Item	Descripción
6. Assay Exposure Time	Muestra el tiempo de exposición requerido para capturar la
7. EXIT	Sale del programa.

Cargando información de BeadChip

Iniciar programa y cargar CD

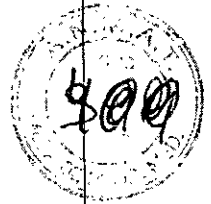
Paso	Acción
1	Enciende la computadora y la fuente de luz.
2	Haga doble clic en el ícono AISR en la pantalla de la computadora..
3	Retire el CD de datos del kit de ensayo del BeadChip.
4	Seleccione Datos y luego Transfiera datos de decodificación desde la esquina superior izquierda de la Ventana de Soluciones BioArray. 

Descargar datos desde CD

Paso	Acción
1	Cuando aparezca esta pantalla, inserte el CD en la unidad, cierre la unidad y seleccione "OK". 
2	Este mensaje se muestra mientras se copian los archivos del clúster 
3	Este mensaje se muestra mientras se copian los archivos de ubicación. 
4	Aparece este mensaje que indica que los archivos se copiaron correctamente 
5	Seleccione "OK" para volver a la pantalla principal. Retire el CD de datos de decodificación.

HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Socio Gerente

HEMOMEDICA S.R.L.
 PAULA ZUCCHINI
 Directora Técnica
 D.N. 12.850



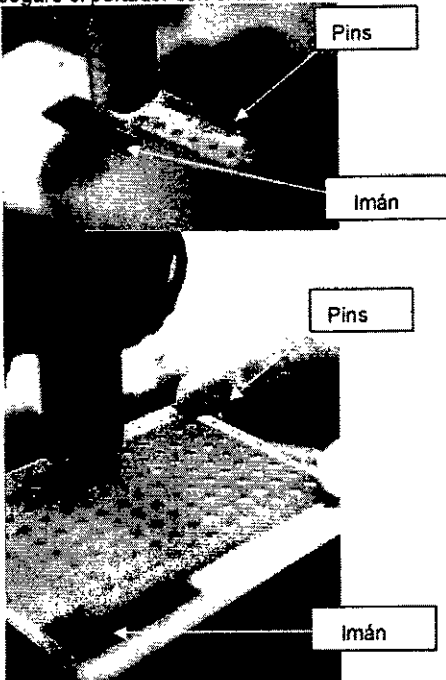
Paso	Acción
	NOTA: No retire el CD hasta que aparezca este mensaje y se seleccione "OK".

Operación en modo estándar

Encienda la fuente de luz y la computadora

Paso	Acción
1	Encender la computadora
2	Encienda la fuente de luz. Cuando la pantalla de la lámpara deja de parpadear, se calienta y está lista.

Inicie el programa AISR y coloque el Carrier de BeadChip en su sitio

Paso	Acción
1	Haga doble clic en el icono AISR en la pantalla de la computadora
2	Coloque el objetivo del microscopio 20X sobre el carrier
3	Una vez que se completa el ensayo y se lava y se seca el BeadChip, coloque el transportador 8-BeadChip contra los tres pines en la platina del microscopio con el código de barras en la parte posterior. (Si usa un 96-BeadChip, coloque el código de barras a la derecha.) PRECAUCIÓN: Asegúrese de que el BeadChip esté colocado en la orientación correcta. El cambio de la dirección de BeadChip causará resultados que no se pueden analizar. <u>Ver imágenes en el paso 4.</u>
4	Asegure el portador con el imán 

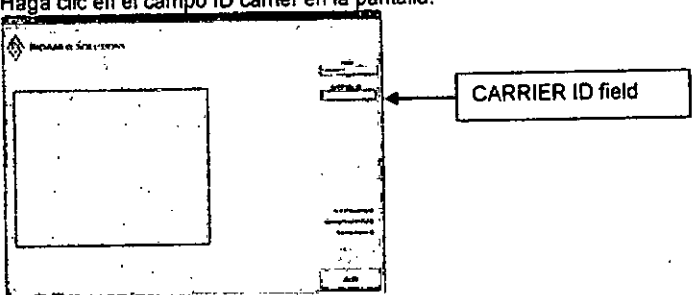

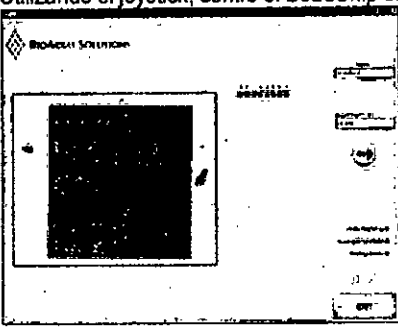

(Signature)
 HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REMOSO
 Socio Gerente

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso
 IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
 PAULA ZUCCHINI
 Página 3 de 12
 011 12 855



Escanear código de barras y matriz de enfoque

Paso	Acción
1	Haga clic en el campo ID carrier en la pantalla. 
2	Utilizando el lector de código de barras, escanee el código de barras BeadChip.  PRECAUCIÓN: No mire el láser en el escáner de código de barras
3	El programa AISR confirma que BeadChip no es de un lote vencido y que el lote existe
4	El sistema coloca automáticamente el primer BeadChip bajo el objetivo del microscopio.
5	Utilizando el joystick, centre el BeadChip en el campo y enfoque la imagen de la matriz. 
	 NOTA: Si la matriz no es visible, cambie al objetivo 4X y centre la imagen. Vuelve al objetivo 20X para el enfoque final.

Comenzar el auto-enfoque

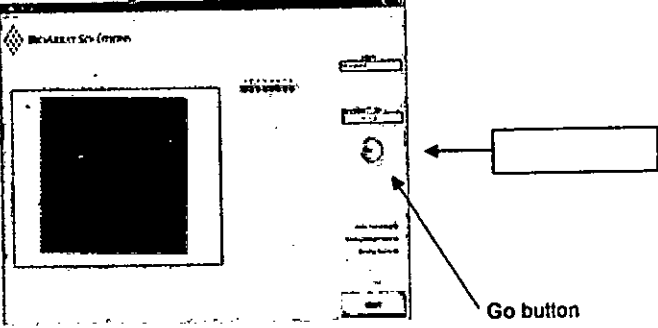
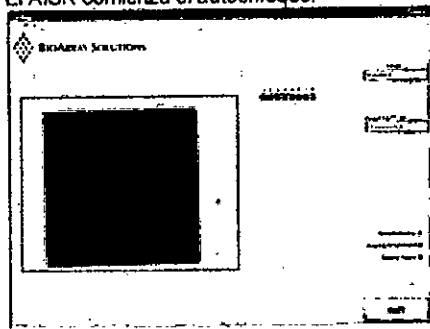
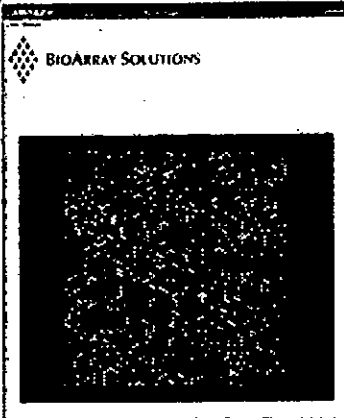
Paso	Acción
1	Asegúrese de que al menos ¼ de la matriz esté dentro del campo de visión.


HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Socio Gerente

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso
 IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
 PABLO A. ZUCCHINI
 Director Técnico
 T.N. 12.853



Paso	Acción
2	<p>Enfoca la imagen hasta que la matriz BeadChip se distinga claramente.</p> 
3	Haga clic en el botón GO en la pantalla.
4	<p>El AISR comienza el autoenfoco.</p> 
5	<p>Una vez que la imagen se enfoca automáticamente, AISR adquiere la imagen.</p> 

Lectura completa del Carrier BeadChip

Paso	Acción
1	El AISR se mueve a la siguiente posición debajo del objetivo y luego repite el enfoque automático y la imagen en cada BeadChip individual hasta que todos se leen.
2	Cuando se leen todos los BeadChips, la etapa vuelve a la posición inicial.


HEMO-MEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Socio Gerente

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso
 IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

HEMO-MEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Página 63 de 107
 D.N. 12.850



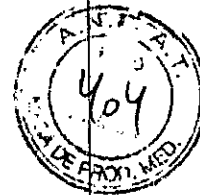
Paso	Acción
3	<p>La pantalla de resumen muestra imágenes en miniatura de BeadChips ocho (8) a la vez, como se muestra a continuación. La fila superior muestra las imágenes del campo brillante. La fila inferior muestra las imágenes fluorescentes. Para ver una imagen con más detalle, haga clic en la imagen en miniatura.</p>

Revisar en el informe resumen de pantalla

Paso	Acción
1	<p>La pantalla de resumen contiene información sobre imágenes no enfocadas, fallas en la generación de archivos de intensidad de análisis, fallas en el procesamiento de imágenes o Beadchips con fluorescencia excesiva. A continuación se muestra un ejemplo del resumen:</p> <pre> Summary report for Center ID 114446754 User Name = AD11881 Mode = Standard ANALYSIS ABORTED AT CHIP # 96A1810_318 Start Time = 06/12/17 13:10 # of Unfocused Images = 0 # of BeadChip with Excessive Fluorescence = 0 # of Bead Processing Failures = 0 # of Array Intensity File Generation Failures = 0 Lamp Hours = 1247 Pipette Tip = 828 pieces Assay Auto Exposure Multiplier = 4.5 End Time = 06/12/17 13:11 End of report </pre>
2	<p>Tenga en cuenta la (s) posición (es) de cualquier imagen desenfocada, fallos en la generación de archivos de intensidad de ensayo, fallos en el procesamiento de imágenes o fragmentos de cuentas con fluorescencia excesiva. Para ver las imágenes con mayor detalle, haga clic en la imagen en miniatura.</p>
3	<p>Haga clic en "Continuar" para cargar el siguiente operador de BeadChip o para pasar a las siguientes 8 imágenes de un proveedor de 96-BeadChip. Cuando se ejecuta un operador de 96-BeadChip, se puede hacer clic en el botón "Salir de la pantalla" para omitir las imágenes en miniatura restantes</p>

HEMOMEDICA S.R.L.
 SERGIO A. REMISO
 Socio Gerente

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso
 IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
 PÁGINA 62 DE 70
 LA ZUCCHINI
 S.R.L. - 12.850
 -A.N. 12.850



Informe resumido impreso

Resumen Impreso del informe de fotografia

La siguiente fotografia muestra un ejemplo del Informe de resumen impreso. Si hay una impresora conectada a la computadora, el Informe de resumen se imprimirá automáticamente.

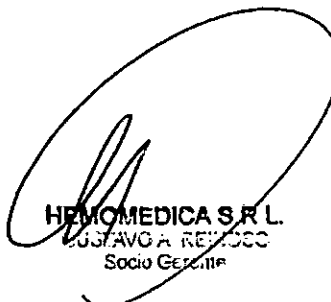
```
Summary report for Carrier ID: 15646608
User Name = ASD1095
Mode = Standard
BeadChip Model ID: A1 Chip # 1 CARL000 2 HI
Start Time = 05/15/13 13:10
# of Unfocused Images = 0
# of BeadChips with Excessive Fluorescence = 0
# of Image Processing Failures = 0
# of Assay Intensity File Generation Failures = 0
# of Lamp Hours = 1247
Exposure Time = 620 mSec
Assay A - BeadChip Intensity = 4.5
End Time = 05/15/13 13:11
End of report
```

- Número de código de barras de BeadChip
- Nombre de usuario
- Modo de lectura (estándar o retrabajo).
- "Fecha y hora" de inicio de lectura de BeadChip
- nº de imágenes desenfocadas
- nº de fallas en la generación de archivos de intensidad de ensayo
- nº de fallas en el procesamiento de imágenes
- nº de Beadchips con Fluorescencia Excesiva
- Horas de la lámpara = (número de horas que se ha usado la lámpara)
- Tiempo de exposición = (número de milisegundos de exposición fluorescente)
- "Fecha y hora" de finalización de lectura de BeadChip
- Fin del informe

Operación en modo retrabajo

Inicie el programa AISR y coloque el carrier de BeadChip en el escenario

Paso	Acción
1	Si AISR no se está ejecutando, haga doble clic en el icono de AISR en la pantalla
2	Si la fuente de luz no está encendida, encienda la fuente de luz y espere a que la pantalla deje de parpadear.
3	Coloque el transportador 8-BeadChip contra los tres pines en el microscopio con el código de barras hacia atrás. (Si utiliza un transportista 96-BeadChip, coloque el código de barras a la derecha).
	PRECAUCIÓN: Asegúrese de que el BeadChip esté colocado en la orientación correcta.
4	Coloque el objetivo del microscopio 20X sobre el carrier.


HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO REVOLLO
 Socio Gerente

190-20185-EN-Rev. C AIS Manual Uso
 IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
 ANITA ZUCCHINI
 Directora Técnica
 +54.11.12.855

405

Paso	Acción
5	Asegure el portador con el imán.

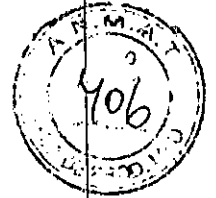
Seleccione el modo de trabajo

Paso	Acción
1	Seleccione el modo "Rework" en el campo Modo.
2	Haga clic en el campo ID del carrier en la pantalla.
3	
4	Utilizando el lector de código de barras, escanee el código de barras del portador BeadChip. PRECAUCIÓN: No mire el láser en el escáner de código de barras

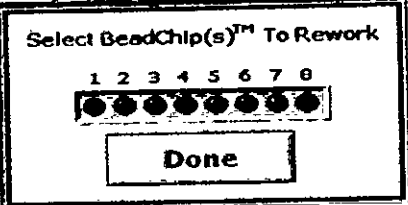
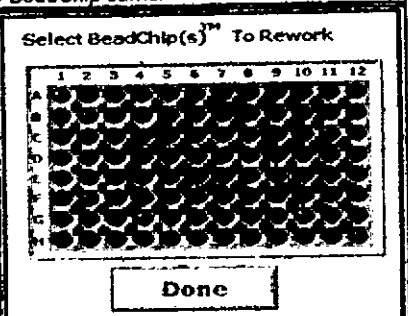
HEMOMEDICA S.R.L.

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso
IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

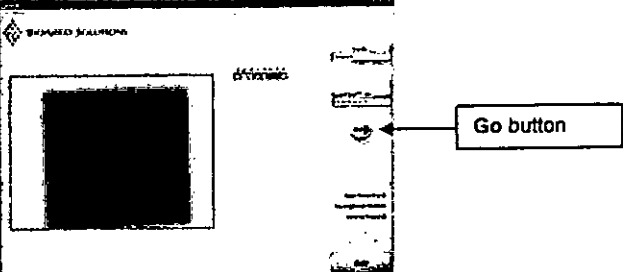
HEMOMEDICA S.R.L.
 ZUCCHINI
 Página 64 de 104 Técnica
 N.º 12.850



Seleccionar posición (es) para ser re trabajado

Paso	Acción
1	<p>Cuando aparezca la ventana, seleccione la (s) posición (es) para volver a trabajar y haga clic en "Listo". Las posiciones seleccionadas cambian a verde.</p>  <p>8-BeadChip carrier</p> 
2	El equipo posiciona automáticamente el primer BeadChip seleccionado bajo el objetivo del microscopio.

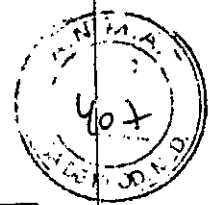
Enfoque BeadChip array

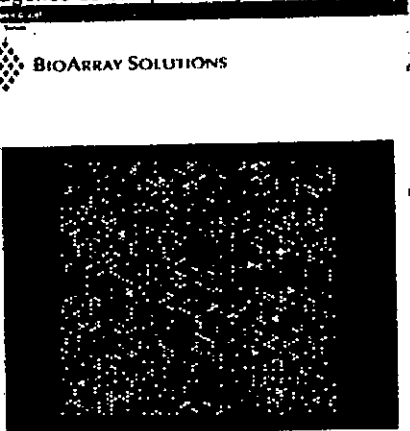
Paso	Acción
1	Utilizando el joystick, centre el BeadChip en el campo y enfoque la imagen
2	 <p>NOTA: Si la matriz no es visible, cambie al objetivo 4X y centre la imagen. Regresa al objetivo 20X para el enfoque final.</p>
3	Asegúrese de que al menos ¼ de la matriz sea visible en el campo de visión.

Comenzar el auto-enfoque

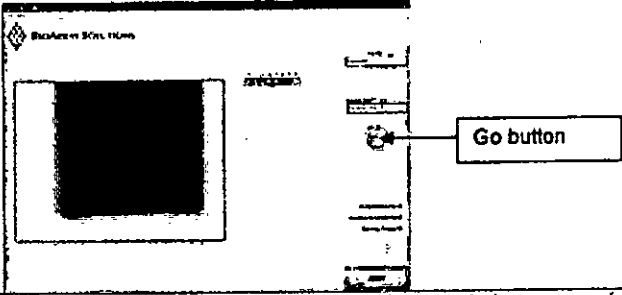

Paso	Acción
1	El AISR comienza el autoenfoque.

[Handwritten signature]
HEMOMEDICA S.R.L.



Paso	Acción
2	<p>Cuando la imagen está enfocada, AISR adquiere automáticamente las imágenes de campo claro y de ensayo.</p> 

Lectura completa de BeadChip carrier

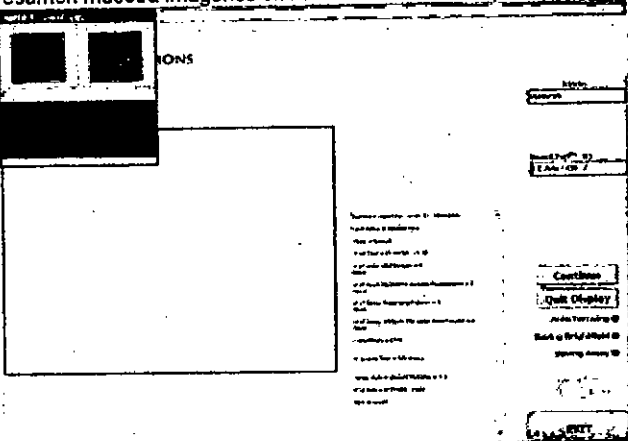
Paso	Acción
1	El AISR se mueve a la siguiente posición de retrabajo seleccionada bajo el objetivo y se detiene.
2	<p>Centre y enfoque el BeadChip y luego haga clic en el botón IR. Repita para cada matriz siendo re-imagen</p> 
	<p>NOTA: Cada BeadChip solo se puede volver a trabajar por un máximo de UNA vez.</p>


HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO BENOSO

190-20185-EN-Rev. C AIS Manual Uso
 IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
 PAOLA ZUCCHINI
 Técnica
 Página 4 de 9
 1.N. 12.855



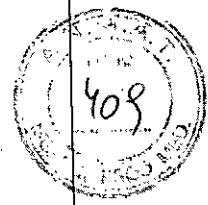
Revisar la pantalla de resumen / informe

Paso	Acción
1	<p>Una vez que se vuelve a crear la imagen del último BeadChip, la etapa vuelve a su posición inicial, lista para el siguiente operador de BeadChip. La pantalla de resumen muestra imágenes en miniatura de BeadChips seleccionados</p> 
2	<p>La pantalla de resumen contiene información sobre imágenes no enfocadas, fallas en la generación de archivos de intensidad de análisis, fallas en el procesamiento de imágenes o Beadchips con fluorescencia excesiva.</p>


HEMO MEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso
IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

HEMO MEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Página 6
Operador Técnico
N.º 12.855



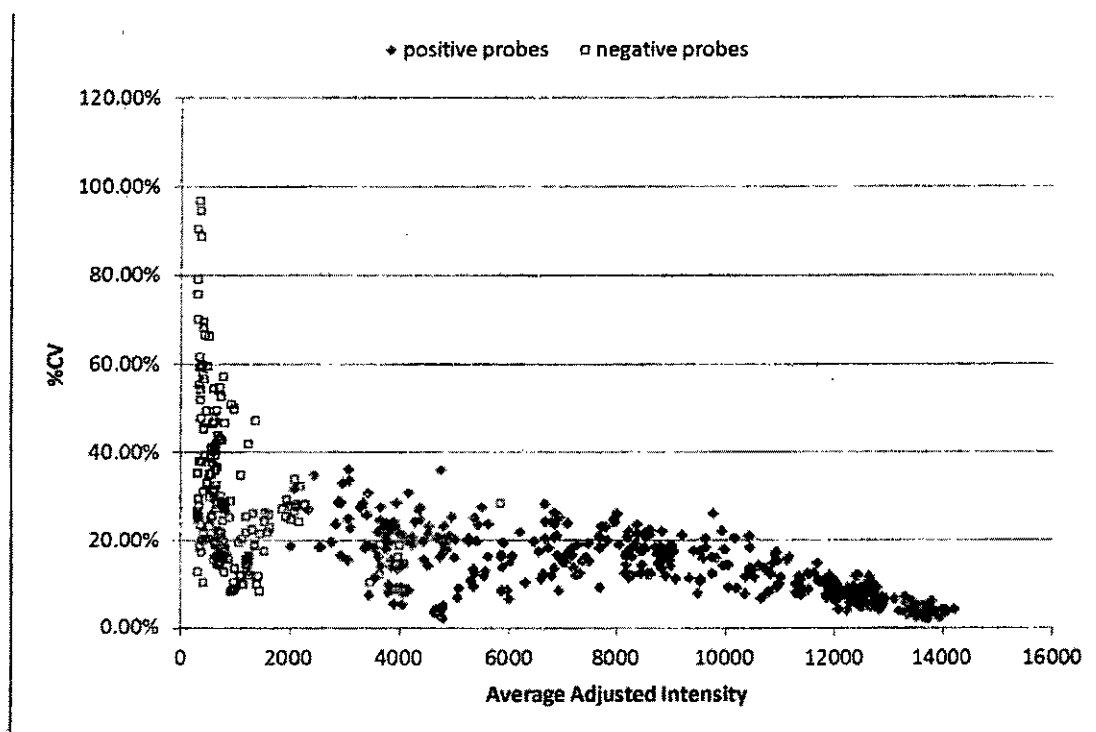
AIS Performance

Las muestras de ADN genómico bien caracterizadas (11) se analizaron utilizando la prueba Molecular BeadChip Molecular PreciseType™ de Immucor en réplica (n = 2) para cada lote (3 lotes en total). Las muestras analizadas se leyeron luego utilizando tres instrumentos AIS diferentes. Un total de dieciocho lecturas de intensidad de ensayo estaban disponibles para cada muestra.

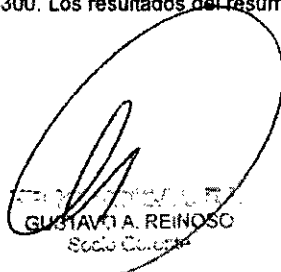
Las muestras de control positivo externo (HEA BeadCheck) se analizaron una vez (n = 1) para cada lote. Las muestras analizadas se leyeron luego utilizando tres instrumentos AIS diferentes. Se dispuso de un total de nueve lecturas de intensidad de ensayo para cada conjunto de control (Ref-pA y Ref-pB).

La intensidad media ajustada, la desviación estándar y el% CV para cada señal de sonda (un total de 52 sondas para cada muestra) se calcularon para las 13 muestras. La Figura 1 representa el valor de % CV de cada sonda contra su intensidad ajustada promedio, y diferencia cada sonda como una llamada positiva o negativa.

Figura 1. % CV Intensidad media ajustada para todas las señales de la sonda; llamadas positivas y negativas.



De un total de 676 sondas analizadas, 588 señales de sonda estaban por encima del corte de baja intensidad de señal de 300. Los resultados del resumen de estas sondas se presentan en la Tabla 1.


GUSTAVO A. REINOSO
Socio Colaborador

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso
IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Página 68 de 104
Técnica
12.850

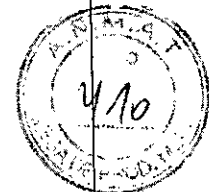


Tabla 1: Intensidad media de la señal de la sonda (A) y % CV (B) para todas las sondas con intensidades de señal superiores a 300.

(A)

	Intensidad
Min	301
Max	14211
Promedio	6317
Median	5598
Std. Dev.	4655

(B)

	% CV
Min	2%
Max	97%
Promedio	19%
Median	16%
Std. Dev.	14%

De las intensidades medias ajustadas de la sonda superiores a 300, 409 se encontraron en un estado positivo mientras que 179 se encontraron en un estado negativo. El resumen de los resultados de las sondas en estado positivo o negativo de todas las muestras se presenta en la Tabla 2 y 3.

Tabla 2: Resumen de los resultados de intensidad de la sonda (A) y% CV (B) para las sondas en estado positivo

(A)

	Intensidad
Min	2016
Max	14211
Promedio	8655
Median	8592
Std. Dev.	3587

(B)

	%CV
Min	2%
Max	36%
Promedio	14%
Median	12%
Std. Dev.	7%


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Suiza C. S. S. S. S.



Tabla 3: Resumen de los resultados de intensidad de la sonda (A) y% CV (B) para las sondas en

estado negativo.

(A)

	Intensidad
Min	301
Max	5867
Promedio	974
Median	703
Std. Dev.	832

(B)

	%CV
Min	8%
Max	97%
Promedio	31%
Median	27%
Std. Dev.	18%

El % de CV puede ocupar un amplio rango debido a una serie de posibles razones, incluida la variabilidad que surge de un ensayo a otro, de un lote a otro, el orden de lectura del ensayo y las variaciones dentro y entre los instrumentos. Para evaluar el efecto de esta variación en los resultados del ensayo, la relación "delta" (que se utiliza para determinar el genotipo asociado con cada polimorfismo y se define como la diferencia de las intensidades de la sonda dividida por la suma de las intensidades de la sonda asociadas con una mutación) se calculó y trazó para cada polimorfismo para todas las muestras y para todos los instrumentos. Una inspección de los gráficos delta de cada par de sondas para cada polimorfismo demuestra que los valores altos dentro del% de muestra dentro de la muestra no afectan la capacidad de identificar y discriminar entre los genotipos y, por lo tanto, los resultados del ensayo (las llamadas del genotipo que fueron 100% concordantes) . La Figura 2 es un conjunto de datos representativos del par de sondas COA / COB SNP, como ejemplo para ilustrar este punto.

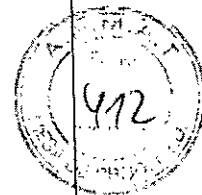
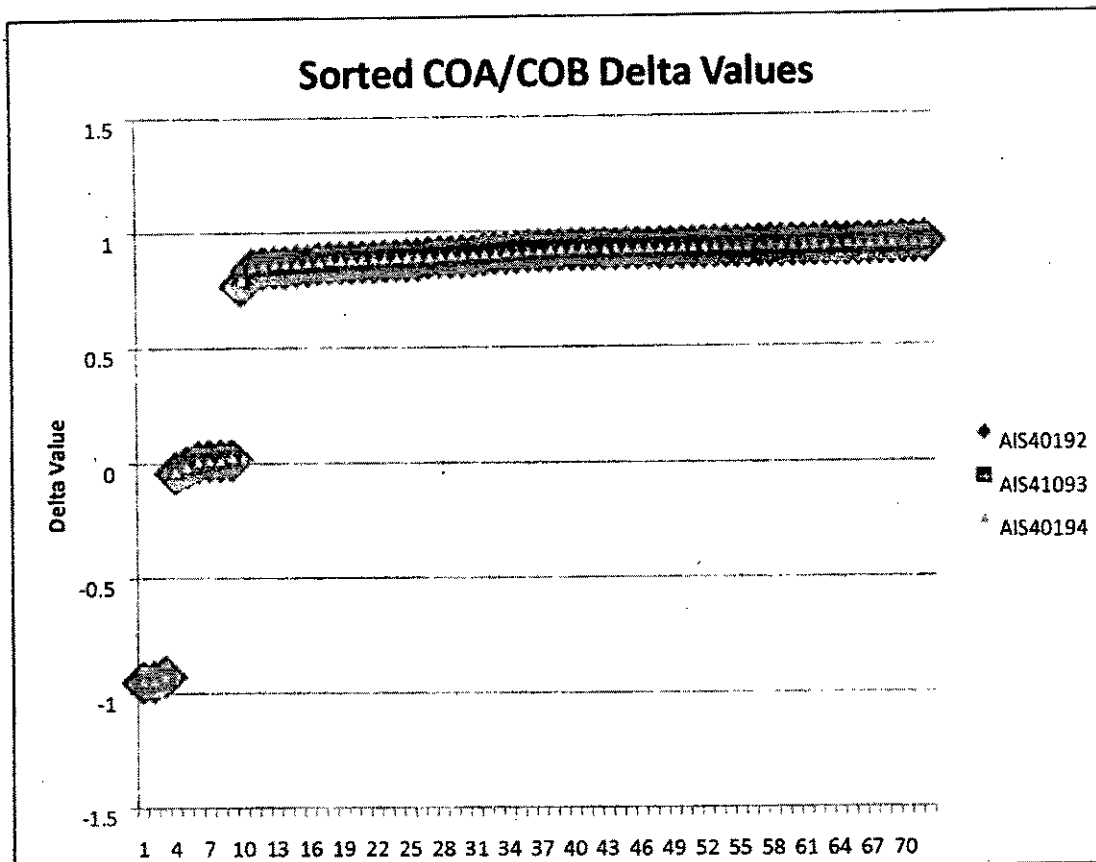


Figura 2: gráfico delta para los valores delta de COA / COB producidos por todas las muestras analizadas en todos los instrumentos.



El análisis de todas las señales de intensidad de la sonda de 13 muestras medidas en múltiples réplicas en múltiples instrumentos AIS produce un % CV promedio del 19%, con un rango entre el 2% y el 97%. La variación producida por estas mediciones no tiene un impacto significativo en los resultados del análisis de la muestra, como lo demuestran los valores delta consistentes y los resultados genotípicos producidos a partir de estas muestras en todos los instrumentos.


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. ESPINOSA
Coordinador

190-20185-EN Rev. C AIS Manual Uso
IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. ZUCCHINI
Página 7 de 1746
11/11/2019



HPA de Immucor: Ensayo Molecular BeadChip

IMMUCOR

HPA de Immucor

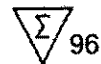
ENSAYO MOLECULAR BEADCHIP



BioArray Solutions Ltd.
35 Technology Drive, Suite 100
Warren, NJ 07059 EE. UU.



Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Adam-Opel-Strasse 26 A
63322 Rödermark (ALEMANIA)



N.º ref. 190-10204-ES Rev. E

Fecha de revisión 04-2016

página 1

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Gerente
Página 72 de 174

Índice

I.	INTRODUCCIÓN	3
A.	Uso previsto.....	3
B.	Resumen de la prueba.....	3
C.	Descripción del producto	3
II.	CONTENIDO DEL KIT BEADCHIP, EQUIPO Y SUMINISTROS NECESARIOS	5
A.	Contenido del kit HPA (800-10182).....	5
B.	Equipo necesario	5
C.	Equipo recomendado.....	6
D.	Suministros necesarios	7
III.	DEFINICIÓN DE SÍMBOLOS	8
IV.	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.....	9
V.	TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD.....	11
VI.	RECOGIDA DE MUESTRAS.....	11
VII.	PROCEDIMIENTO.....	12
A.	Programming the Thermal Cycler	12
B.	Notas acerca del procedimiento.....	12
C.	Preparación del reactivo	13
D.	Protocolo de PCR multiplexada	13
E.	Procesamiento post-pcr; tratamiento con amplicones	14
F.	Procesamiento Post-PCR: generación de la diana monocatenaria	15
G.	Elongación y lectura de la matriz On-BeadChip	16
H.	Adquisición de imágenes de BeadChip.....	17
VIII.	RESULTADOS ESPERADOS	18
A.	Evaluación: Control de calidad.....	18
B.	Análisis de los resultados	18
IX.	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	21
X.	CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO	22
XI.	BIBLIOGRAFÍA	24



Kit HPA BeadChip

I. INTRODUCCIÓN

A. Uso previsto

El kit HPA BeadChip™ es una prueba de diagnóstico diseñada para la determinación molecular de las variantes alélicas que indican los fenotipos HPA 1-9, 11 y 15 de antígenos plaquetarios en ADN genómico humano.

B. Resumen de la prueba

El kit BioArray Solutions HPA BeadChip™ usa la tecnología patentada de análisis de polimorfismos multiplexado mediado por elongación (eMAP®) para identificar la presencia o ausencia de alelos seleccionados asociados a un fenotipo dado. Tras la amplificación PCR multiplex y la digestión de Lambda Exonuclease, el ADN monocatenario restante se incuba en la matriz BioArray Solutions BeadChip™, lo que permite a los oligonucleótidos fusionarse con las sondas correspondientes. La reacción de elongación posterior extiende e incorpora moléculas dCTP marcadas con fluorescencia sólo en aquellas sondas donde el extremo 3' se corresponde exactamente con el oligonucleótido hibridado. Los productos de elongación de los alelos A y B se detectan de forma simultánea mediante la imagen de toda la matriz.

En este método, cada sonda se fija de forma covalente a un tipo de cuenta (bead) espectralmente distinguible. Una biblioteca de microesferas individuales contiene todas las sondas de interés, incluidos positivos, negativos, así como controles del sistema. La biblioteca está inmovilizada en la matriz BeadChip, lo que permite la detección simultánea de los polimorfismos de interés.

Se emplea el Array Imaging System de BioArray (AIS400) para capturar la señal fluorescente en las cuentas individuales de una imagen de la matriz, determinar la identidad de la cuenta mediante su posición en la matriz y notificar la intensidad de la señal media, el cociente de variación de las intensidades y el número de cuentas medidas por cada tipo de sonda. El software de análisis de HPA del Sistema de Información de Soluciones BioArray (BASIS™) importa la salida de intensidad bruta, calcula la validez de los controles internos y genera los resultados del ensayo.

C. Descripción del producto

Los aloanticuerpos contra los antígenos plaquetarios humanos (HPA) están implicados en la trombocitopenia aloinmune neonatal (NAIT), púrpura postransfusional (PTP) y refractariedad de la transfusión de plaquetas. El HPA puede también jugar un papel como antígeno de histocompatibilidad en trasplantes. El NAIT es un síndrome raro provocado por anticuerpos maternos dirigidos contra el antígeno plaquetario fetal heredado del padre. Aproximadamente 1 de cada 1000 a 2000 embarazos se ve afectado.¹²

Se han definido veinticuatro aloantígenos plaquetarios específicos mediante suero

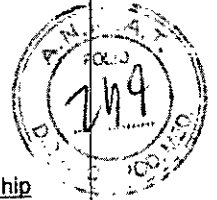
inmunológico, de los que 12 se agrupan en seis sistemas bialélicos (HPA-1, -2, -3, -4, -5, -15). La base molecular de 22 de los 24 antígenos definidos serológicamente se ha resuelto y se puede identificar mediante un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en la glicoproteína de la membrana relevante.¹²

El kit HPA BeadChip™ se emplea para determinar tipos de antígenos plaquetarios humanos (HPA) mediante el análisis de ADN y la predicción de fenotipos en formato de ensayo multiplex.

Los once polimorfismos asociados con los antígenos plaquetarios humanos^[1-11] que se tipifican mediante el kit HPA BeadChip™ se enumeran a continuación.

Sistema	Antígeno	Glicoproteína	Posición SNP	Nucleótido
HPA-1	HPA-1a	GPIIIa	176	T
	HPA-1b			C
HPA-2	HPA-2a	GPIba	482	C
	HPA-2b			T
HPA-3	HPA-3a	GPIIb	2621	T
	HPA-3b			G
HPA-4	HPA-4a	GPIIIa	506	G
	HPA-4b			A
HPA-5	HPA-5a	GPIa	1600	G
	HPA-5b			A
HPA-6*	HPA-6a	GPIIIa	1544	G
	HPA-6b			A
HPA-7*	HPA-7a	GPIIIa	1297	C
	HPA-7b			G
HPA-8*	HPA-8a	GPIIIa	1984	C
	HPA-8b			T
HPA-9*	HPA-9a	GPIIb	2602	G
	HPA-9b			A
HPA-11*	HPA-11a	GPIIIa	1976	G
	HPA-11b			A
HPA-15	HPA-15a	CD109	2108	C
	HPA-15b			A

* El Sistema no está identificado actualmente de forma serológica¹², la información únicamente hace referencia al genotipo. La nomenclatura del antígeno difiere de aquellas del Comité de Nomenclatura de Plaquetas (PNC) en aquellos ejemplos en los que no se haya identificado ningún anticuerpo antitético.



II. CONTENIDO DEL KIT BEADCHIP, EQUIPO Y SUMINISTROS NECESARIOS

A. Contenido del kit HPA (800-10182)

REF.	Descripción	Cantidad*
800-00186	HPA eMAP™ PCR Mix	2 x 900 µl
800-00191	Clean-up Reagent	1 x 330 µl
800-00195	Lambda Exonuclease	1 x 330 µl
800-00193	eMAP™ Elongation Mix	2 x 600 µl
800-10242	HotstarTaq DNA Polymerase	1 x 155 µl
800-00287	Control negativo**	1 x 1000 µl
830-00052	HPA eMAP 8-BeadChip Carrier	12 bandejas x 8 matrices BeadChip
800-10183	HPA Carrier Data CD	1

*Los reactivos líquidos se han sobrellenado para garantizar que se recupere el total de la cantidad indicada.

**Agua para PCR, sin control de ADN

B. Equipo necesario

Descripción	Número de catálogo
Array Imaging System AIS 400	(BioArray) 790-10007, 790-20006, 790-20016
Dispositivo de hibridación (incubación) (Boekel Inslide Out™)	(Boekel) 241000
Termociclador (Veriti de Applied Biosystems)	(Applied Biosystems) 4375786
Nevera (capacidad para mantener temperaturas de 2 a 8 °C)	-
Congelador sin formación de escarcha (con capacidad para mantener temperaturas de -20 °C o menos)	-

HEXOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

Página 76 de 174

C. Equipo recomendado

Descripción	Número de catálogo
Criobloque (Denville o equivalente)	(Denville) R6670
Centrífuga de microplacas (Eppendorf modelo 5430 o equivalente)	(Fisher) 05-400-017
Gradillas de tubos para PCR (recomendadas Fisher Scientific o equivalentes)	(Fisher) 05-541-50
Campaña para estación de trabajo de PCR con luz UV (recomendada CBS Scientific o equivalente)	(CBS Scientific) P-030-02
Pipetas de precisión, multicanal, capaces de suministrar de 0,5 a 10 μ l (recomendadas Fisherbrand® o equivalente) • Exactitud: +/- 12 al 2,4 % • Precisión: < 8 al 1,6 %	(Fisher) 21-377-825
Pipetas de precisión, multicanal, capaces de suministrar de 5 a 50 μ l (recomendadas Fisherbrand® o equivalentes) • Exactitud: +/- 5,0 al 1,5 % • Precisión: < 2,0 al 0,7 %	(Fisher) 21-377-827
Pipetas de precisión, monocanal, capaces de suministrar de 0,5 a 10 μ l (recomendadas Eppendorf o equivalentes) • Exactitud: +/- 2,5 al 1 % • Precisión: \leq 1,8 al 0,4 %	(Fisher) 13-684-250
Pipetas de precisión, monocanal, capaces de suministrar de 10 a 100 μ l (recomendadas Eppendorf o equivalentes) • Exactitud: +/- 3,0 al 0,8 % • Precisión: \leq 1,0 al 0,2 %	(Fisher) 13-684-250
Pipetas de precisión, monocanal, capaces de suministrar de 100 a 1000 μ l (recomendadas Eppendorf o equivalentes) • Exactitud: +/- 3,0 al 0,6 % • Precisión: \leq 0,6 al 0,2 %	(Fisher) 13-684-250
QIAGEN® QiaCube®	(Qiagen) 9001292
Centrifugadora de tubos (recomendada Denville MiniMouse II™ o equivalente)	(Denville) C0801
Mezcladora vorticial con adaptadores para tubo y planos (recomendada Denville o equivalente)	(Denville) S7030

* Los números de referencia del fabricante de pipetas podrían cambiar. Consulte siempre la información descriptiva en su idioma cuando solicite suministros si no está seguro de los números de catálogo.


250

D. Suministros necesarios

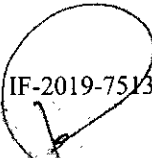
Descripción	Número de catálogo*
Tubos para centrifugadora de 1,5 ml (recomendados Eppendorf™ o equivalentes)	(Fisher) 05-402-24B
Tubos para centrifugadora de 2,0 ml (recomendados Eppendorf™ o equivalentes)	(Fisher) 05-402-24C
Taponos para tubos de termociclador de pared fina de 0,2 ml para tira de 8 tubos (Applied Biosystems o equivalente)	(Applied Biosystems) N8010535
Tubos de termociclador de pared fina de 0,2 ml para tira de 8 tubos (Applied Biosystems, 0,2 ml o equivalente)	(Applied Biosystems) N8010580
Placa para PCR sin faldón de 96 pocillos, PP, de 0,2 ml (Fisherbrand® o equivalente)	(Fisher) 14230232
Agua para lavado BeadChip (recomendada Invitrogen)	(Invitrogen) 10977-023
Aire comprimido o encapsulado, sin aceite (recomendado Fisherbrand® o equivalente)	(Fisher) 23-022523
Descontaminante (recomendado Molecular BioProducts™ DNA AWAY™ o equivalente)	(Fisher) 21-236-28
Kit de extracción de ADN (recomendado minikit de ADN sanguíneo QIAamp® DSP de Qiagen® o equivalente)	(Qiagen) 61104
Puntas de pipeta con filtro desechables (resistentes a aerosoles) que cubren el intervalo de 0,1 a 1000 µl (recomendadas epTIPS™ de Eppendorf™ con filtro o equivalentes)	(Fisher) 05-403-14 (Fisher) 05-403-18 (Fisher) 05-403-20
Precintos para placas de PCR (recomendado film adhesivo transparente MicroAmp® de Applied Biosystems® o equivalente)	(Applied Biosystems) 4306311
Papeles absorbentes de alta calidad multipliegue (recomendados Uline o equivalentes)	(Uline) S-7127

* Los números de referencia del fabricante podrían cambiar. Consulte siempre la información descriptiva en su idioma cuando solicite suministros si no está seguro de los números de catálogo.

página 7





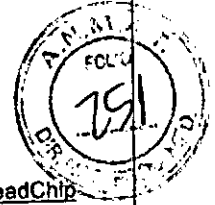
GUSTAVO A. BEINOSO
Socio Gerente



III. DEFINICIÓN DE SÍMBOLOS

Se pueden encontrar los siguientes símbolos especiales en los componentes del kit HPA BeadChip.

Símbolo	Definición
	Contenido.
	CD que contiene los archivos de datos y las instrucciones de uso.



IV. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Todas las muestras sanguíneas deben considerarse potencialmente infecciosas y manejarse aplicando precauciones universales. Use un equipo protector personal adecuado durante todo el análisis, incluidos guantes, protección ocular y bata de laboratorio. En caso de que se produzca contacto con los ojos, lávelos de forma inmediata con abundante agua y busque ayuda médica. Para más información acerca de la seguridad, consulte el sitio web:
<http://extranet.immucor.com/>
2. Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de reactivos o muestras con la piel y membranas mucosas.
3. Deseche los materiales usados de acuerdo con las normativas del centro o locales para la eliminación de materiales potencialmente biopeligrosos. Los derrames de material potencialmente infeccioso se deben limpiar y eliminar inmediatamente, con arreglo a las normas del centro y los procedimientos para la manipulación y eliminación de materiales biopeligrosos potencialmente infecciosos.
4. La tecnología de PCR es sensible a la contaminación, especialmente de sus propios productos. Los aerosoles de amplicones para PCR que se generan durante los pasos para después de la PCR son una fuente frecuente de contaminación. Por lo tanto, se debe tener cuidado de evitar las salpicaduras excesivas y la generación de aerosoles. Durante el uso del kit, deben seguirse las buenas prácticas generales de laboratorio para los laboratorios moleculares, lo que incluye limpiar las superficies de trabajo antes del procesamiento o preparación de las muestras para PCR con una solución de lejía al 10 % recién preparada (o equivalente), usar luz ultravioleta (UV) en campanas o armarios de seguridad biológica entre usos, separar en espacio y tiempo las actividades antes y después de la PCR, usar reactivos para PCR en partes iguales, usar controles positivos y negativos, etc. El uso de una técnica constante y meticulosa, además de la incorporación libre y la monitorización de los controles, garantizarán un método seguro y proactivo para el control y la prevención de la contaminación de la PCR.
5. Los laboratorios deben validar sus propios procedimientos de limpieza.
6. La contaminación de los reactivos o las muestras puede provocar resultados erróneos. Por lo tanto, tenga cuidado de evitar la contaminación de este producto durante su uso. No utilice reactivos si sospecha que puedan estar contaminados.
7. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede provocar resultados incorrectos.
8. El incumplimiento de las directrices de uso recomendadas puede provocar un rendimiento no óptimo del producto. En función de la naturaleza y gravedad del incumplimiento, puede producirse un fallo del análisis (muestra individual o fallos de la ejecución) o unos resultados erróneos.

9. Use los reactivos del kit y las bandejas BeadChip tal como se suministran. Su dilución o alteración puede generar resultados erróneos.
10. No mezcle reactivos ni bandejas BeadChip de lotes diferentes.
11. No utilice viales con fugas. No utilice viales sin etiquetar.
12. Las muestras o reactivos previamente congelados deben mezclarse bien y centrifugarse posteriormente después de descongelarlos y antes de las pruebas. Evite la generación de espuma y burbujas en las muestras.
13. Mantenga todos los reactivos, incluidas las enzimas y las mezclas maestras, en hielo o criobloques (de 2 a 8 °C) durante su uso.
14. Compruebe el correcto sellado de los tubos de muestras antes de la amplificación para impedir la evaporación durante los ciclos de variación térmica.
15. A causa de las diferencias inherentes en los mecanismos del funcionamiento del termociclador, puede producirse una variación en los resultados al transferir perfiles térmicos establecidos entre diferentes marcas y modelos de instrumentos termocicladores. En algunos casos, la especificidad y la sensibilidad de la reacción pueden verse afectadas, lo que puede provocar una interpretación y comunicación falsas de los datos. Applied Biosystems Veriti es el termociclador recomendado para este análisis. Immucor no garantiza el rendimiento del análisis con el uso de termocicladores y perfiles alternativos, que debe validar el usuario.
16. Durante el paso de elongación, las muestras deberán permanecer en el pocillo de reacción BeadChip, en la placa o en el portaobjetos.
17. Unos tiempos de incubación o unas temperaturas distintas a las especificadas pueden dar resultados erróneos.
18. Cada día de uso, antes de utilizar el AIS 400, los usuarios deberán realizar el procedimiento del test de exposición de la bandeja (ETC) para verificar el rendimiento del AIS. Si el test de exposición resulta fallido, póngase en contacto con el servicio técnico para obtener las instrucciones adecuadas.



V. TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los reactivos del kit HPA BeadChip, incluidas la mezcla de cebadores y todas las enzimas, se transportan en hielo seco. Cuando reciba el kit, compruebe que el hielo seco permanece en el envase. Si no hay hielo, no utilice el kit y póngase en contacto con el distribuidor o el servicio de atención al cliente de BioArray Solutions. Asimismo, póngase en contacto con el representante del servicio al cliente si la bolsa de la bandeja BeadChip sellada al vacío se ha abierto o dañado durante el transporte.

Conserve todos los reactivos del test, incluidas la mezcla de cebadores y todas las enzimas, a una temperatura de entre -20 y -80 °C en un congelador sin formación de escarcha. Utilice criobloques de sobremesa o hielo cuando sea posible.

Guarde las bandejas BeadChip a una temperatura de 2-8 °C hasta su uso. Las bandejas sin usar deben devolverse de forma inmediata a su almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C en su envase original. Las bandejas BeadChip no se pueden reutilizar.

Consulte la fecha de caducidad de todos los componentes del kit. No utilizar después de la fecha de caducidad. El formato de la fecha de caducidad es AAAA-MM-DD. Los componentes de este kit pueden presentar una fecha de caducidad que es mayor que la fecha de caducidad de todo el kit. La vida útil más corta (esto es, la fecha de caducidad más temprana) de cualquier componente del kit se indica en la etiqueta externa del kit.

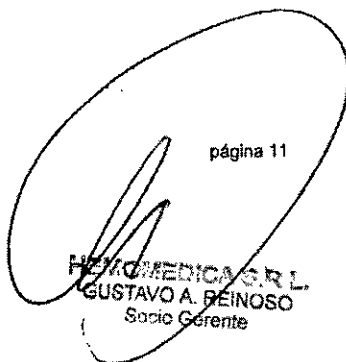
VI. RECOGIDA DE MUESTRAS

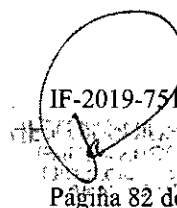
Muestra: Se recomienda extraer las muestras de sangre con tubos con anticoagulante EDTA (números de producto BD 366643, 368661, 367654). Se recomienda extraer las muestras de ADN con ayuda del kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (QIAGEN n.º de cat. 61104), de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. El uso de otros procedimientos requiere la validación del cliente.

Sustancias interferentes: La contaminación del ADN por parte de inhibidores de la PCR, como citrato¹³, heparina¹³, hemoglobina, etanol, etc., puede interferir con la reacción de PCR.

Almacenamiento: El ADN genómico debe conservarse a -20 °C o menos en un congelador sin formación de escarcha hasta su uso. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.

Preparación: Se necesita una concentración de ≥ 10 ng/ μ l de ADN genómico extraído para una amplificación óptima por PCR.


HEXOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. BEINOSO
Socio Gerente


IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
Página 82 de 174

VII. PROCEDIMIENTO

A. Programming the Thermal Cycler

Ensure heated lid option is selected.

Programa PCR HPA:

94°C 15 min

94°C 30 s, desnivel del 60%	} 35 cycles
62°C 30 s, desnivel del 50%	
72°C 50 s, desnivel del 35%	

72°C 8 min

4°C hasta 72 horas

Programa "Limpieza de HPA" (HPA Clean Up):

37°C 15 min

85°C 8 min

4°C hasta 3 horas

Programa de generación de diana monocatenaria de HPA:

37°C 15 min

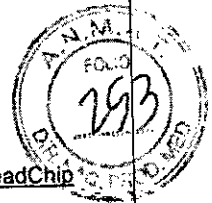
85°C 8 min

4°C hasta 3 horas

***Nota:** Debido a las diferencias entre los termocicladores individuales, se debe validar cada instrumento con muestras conocidas para evaluar su funcionamiento.

B. Notas acerca del procedimiento

1. Se precisa un control negativo por cada procesado. Se recomienda el uso de una muestra bien caracterizada como control positivo por cada procesado.
2. Pueden emplearse pipetas multicanal o de canal único en función de las preferencias del laboratorio. Todas las pipetas empleadas deben calibrarse. El volumen de llenado del reactivo es suficiente para las pipetas sugeridas dentro de este procedimiento.
3. Tenga cuidado en mezclar de forma correcta las muestras y reactivos; evite la formación de espuma.
4. Extraiga las cantidades necesarias de reactivos, muestras y controles de almacenamiento y, si están congelados, deje que se descongelen antes de su uso.
5. Retire las bandejas BeadChip de su medio de conservación y colóquelas a temperatura ambiente antes de usarlas.
6. Es sumamente importante evitar la contaminación cruzada entre los pocillos BeadChip. Tenga cuidado al pipetear, enjuagar y eliminar los líquidos.



7. Es necesario el uso de un pipeteo preciso de las muestras y reactivos para obtener unos resultados precisos.
8. El sistema de imágenes de matrices AIS 400 de BioArray Solutions y el horno de hibridación (Boekel Inside-Out, modelo 241000 o equivalente) deben encenderse al menos 30 minutos antes de su funcionamiento.

C. Preparación del reactivo

1. Determine el número total de muestras y controles que va a realizar.
2. Descongele los reactivos congelados y mézclelos antes de su uso. Devuelva de forma inmediata las porciones sin usar para su conservación correcta.
3. Use los cuadros que se adjuntan para preparar los reactivos de trabajo. Los cuadros se presentan como directrices, que ofrecen aproximadamente un 10 % más de reactivo de trabajo de lo necesario para realizar el análisis (el volumen para una muestra es preciso sin reactivo en exceso).
4. Combine los reactivos de trabajo justo antes de su uso.
5. Prepare la Mezcla Maestra PCR (en una campana) según la siguiente tabla. Manténgala en hielo hasta que sea necesario y mézclela antes de su uso.

Número de muestras	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
HPA eMAP PCR Mix (µL)	16	150	304	432	592	720	880	1008	1168	1296	1456	1584	1744
HotstarTaq DNA Polymerase (µL)	1,0	9,4	19,0	27,0	37,0	45,0	55,0	63,0	73,0	81,0	91,0	99,0	109,0

* La tabla está diseñada como una guía y proporciona aproximadamente entre el 10 y el 20% más de reactivo de trabajo que el necesario para realizar el análisis.

D. Protocolo de PCR multiplexada

Nota: Se recomienda que se asignen zonas separadas para los procedimientos pre-PCR y post-PCR como precaución frente a la contaminación por transferencia. Se deben realizar los pasos 1 y 2 en la zona anterior a la PCR, y se deben emplear puntas de pipetas resistentes a aerosoles.

1. Prepare suficiente mezcla maestra de PCR para el número de muestras que se van a emplear en la prueba. Remítase a la tabla de la sección C. Al calcular el número de pruebas, incluya los controles.
2. Con ayuda del cuadro que se muestra a continuación, alicuotar la mezcla maestra de PCR en una tira de ocho tubos.

Hasta la muestra n.º	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volumen (µl) por tubo de la tira	Vaya al paso 3	38,0	56,0	76,0	92,0	112,0	128,0	148,0	164,0	188,0	200,0	224,0

3. Dispense 17,0 µl de mezcla maestra de PCR en una placa PCR de pared fina

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. BEINOSO
Socio Gerente

HEMOMEDICA S.R.L.
IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
Página 84 de 174

debidamente etiquetada (use únicamente puntas con filtro).

4. Selle la placa y muévase a la zona de adición del ADN, fuera de la campana pre-PCR.
5. Vierta, con una pipeta, 8,0 µl de ADN preparado en cada uno de los pocillos de PCR y mezcle tres veces mediante aspiración con pipeta (use únicamente puntas con filtro).
6. Para el control negativo, vierta, con una pipeta, 8,0 µL de control negativo (incluido en la caja del kit de reactivos de HPA) en el pocillo correspondiente y mezcle tres veces mediante aspiración con pipeta (use únicamente puntas con filtro).
7. Con cuidado, selle la placa, mezcle suavemente y centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos.
8. Coloque los tubos para PCR de pared fina sellados en el termociclador Veriti de Applied Biosystems y ejecute el perfil de PCR que se muestra a continuación, con la tapa calefactada activada. Compruebe que el protocolo PCR para la amplificación de HPA esté programado correctamente y seleccionado.

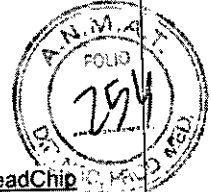
94 °C	15 min	} 35 ciclos
94 °C	30 s, desnivel del 60 %	
62 °C	30 s, desnivel del 50 %	
72 °C	50 s, desnivel del 35 %	
72 °C	8 min	
4 °C	hasta 72 horas	

9. Extraiga los tubos de producto post-PCR de pared fina del termociclador y centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm durante 5 segundos).

Nota: Las muestras y los controles centrifugados deberán usarse de inmediato, pero pueden conservarse a una temperatura de -20 °C (o inferior) durante un máximo de cuatro semanas.

E. Procesamiento post-pcr; tratamiento con amplicones

1. Mezcle bien los productos de PCR y centrifúgelos para llevar las muestras al fondo de los pocillos.
2. Prepare una nueva placa etiquetada.
3. Pipetear 7,0 µL de cada producto PCR en el fondo de cada nueva placa usando **solamente puntas con filtro**.
4. Alicuote el reactivo de limpieza para su funcionamiento en una tira de 8 tubos. Use el cuadro que aparece debajo para determinar la cantidad. Vuelva a almacenar el reactivo Clean-up Reagent sin usar y mantenga los reactivos de trabajo en hielo.



Hasta la muestra n.º	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volumen (µl) de Clean-up Reagent por tubo en tira	Vaya al paso 5	6,0	9,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0	24,0	26,0	28,0

- Añada 2,0 µl de Clean-up Reagent a cada pocillo y mézclelo tres veces mediante aspiración por pipeta. Deseche el reactivo de trabajo sin usar. Se pueden emplear puntas sin filtro.
- Selle bien la placa y mezcle bien en vórtice. Centrifugue brevemente para llevar la solución al fondo de los pocillos.
- Coloque los tubos para PCR de pared fina sellados en el termociclador Veriti de Applied Biosystems y ejecute el perfil siguiente: Compruebe que el protocolo para el procesamiento post-PCR, tratamiento con amplicones esté programado correctamente y seleccionado.
37 °C 15 min.
85 °C 8 min.
4 °C hasta 3 horas
- Extraiga los tubos para PCR de pared fina del termociclador y centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm, 5 segundos).

Nota: Las muestras y controles centrifugados deberán usarse inmediatamente, aunque también pueden conservarse a -20 °C durante un máximo de 72 horas.

F. Procesamiento Post-PCR: generación de la diana monocatenaria

- Mezcle brevemente y centrifugue la placa para llevar la solución al fondo de los pocillos.
- Alicuote el reactivo de trabajo de Lambda Exonuclease para su ejecución en una tira de ocho tubos. Use el cuadro que aparece debajo para determinar la cantidad necesaria. Devuelva el reactivo de exonucleasa sin utilizar para conservarlo y siga trabajando con los reactivos en hielo.

Hasta la muestra n.º	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volumen de Lambda Exonuclease (µl) por tubo en la tira	Vaya al paso 3	6,0	9,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0	24,0	26,0	28,0

- Añada 2,0 µl de Lambda Exonuclease a cada pocillo y mézclelo tres veces mediante aspiración con pipeta. Deseche la solución de trabajo sin utilizar. Se pueden emplear puntas sin filtro.

4. Selle bien la placa y mezcle bien en vórtice. Centrifugue brevemente para llevar la solución al fondo de los pocillos.
5. Coloque los tubos para PCR de pared fina sellados en el termociclador Veriti de Applied Biosystems y ejecute el perfil siguiente. Compruebe que el protocolo para el procesamiento posterior a la PCR: generación de la diana monocatenaria esté programado correctamente y seleccionado.
 - 37 °C 15 min.
 - 85 °C 8 min.
 - 4 °C hasta 3 horas
6. Extraiga los tubos para PCR de pared fina del termociclador y centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm, 5 segundos).

Nota: Las muestras y controles monocatenarios centrifugados deberían usarse inmediatamente, pero pueden conservarse a -20 °C durante un máximo de 72 horas.

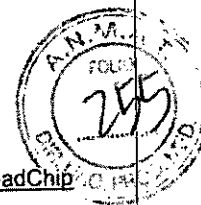
G. Elongación y lectura de la matriz On-BeadChip

Nota: Los pasos del 3 al 10 deben realizarse sin interrupción.

1. Encienda el horno de hibridación (Boekel Inslide-Out o equivalente) y prepárelo para su uso. Para ello, asegúrese de que dispone de una toallita de papel húmeda para mantener las condiciones de humedad durante la incubación. Asegúrese de que el horno de hibridación se encuentra a la temperatura correcta (55 °C).
2. Extraiga suficientes bandejas de HPA 8-BeadChip de la nevera y deje que se calienten a temperatura ambiente durante un máximo de 30 minutos.
3. Mezcle brevemente en vórtice y centrifugue la placa para llevar las muestras al fondo de los pocillos.
4. Alicuote el reactivo de Elongación eMAP® para su procesamiento en una tira de ocho tubos. Tenga cuidado para evitar que se forme espuma. Use el cuadro que aparece debajo para determinar la cantidad necesaria. Devuelva la mezcla de prolongación eMAP® en existencias al medio de conservación y siga trabajando con los reactivos sobre hielo.

Hasta la muestra n.º	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
eMAP® Elongation Mix; volumen (µl) por tubo de la tira	Vaya al paso 5	25,0	37,0	47,0	60,0	70,0	80,0	90,0	100,0	114,0	125,0	135,0

5. Añada 10,0 µl de eMAP® Elongation Mix a cada muestra y mézclelo tres veces

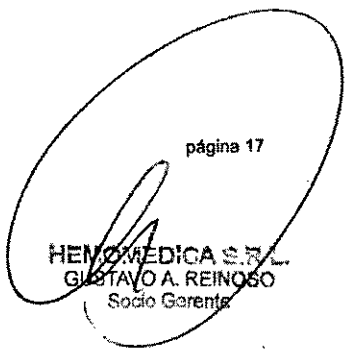


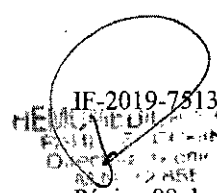
mediante aspiración con pipeta. Deseche el reactivo de trabajo sin usar. Se pueden emplear puntas sin filtro.

6. Transfiera 18,0 µL de esta mezcla de reacción de elongación al correspondiente HPA BeadChip™. Se pueden emplear puntas sin filtro.
7. Coloque la(s) bandeja(s) BeadChip™ en el horno de hibridación e incúbelas durante 20 minutos a 55 °C.
8. Encienda la fuente lumínica de BioArray Solutions AIS400 y el ordenador.
9. Retire las bandejas BeadChip™ del horno y elimine la mezcla de elongación de la superficie de la matriz limpiando bien la bandeja con una corriente continua de H2O destilada o desionizada de una botella sobre un recipiente de captura. Aclare cada BeadChip individualmente bajo una corriente de lavado BeadChip a presión constante. La corriente de agua debe dirigirse perpendicularmente a la cara del portaobjetos desde aproximadamente una pulgada de distancia, para enjuagar el centro de cada BeadChip. Aclare cada BeadChip durante 3 segundos.
10. Retire el H2O restante de la bandeja mediante aire comprimido/encapsulado. No agite el aire comprimido. Retire cualquier exceso de agua de la parte posterior de la bandeja con un trapo de limpieza desechable.

H. Adquisición de imágenes de BeadChip

1. Abra e inicie el programa AISR en el escritorio.
2. Ejecute el procedimiento de la bandeja del test de exposición (ETC, Exposure Test Carrier) (consulte el manual del usuario de AIS 190-00185 o 190-20185). Si los resultados no son los indicados en las especificaciones, póngase en contacto con BioArray para ajustar el tiempo de exposición antes de continuar.
3. Extraiga el CD de datos de HPA de la caja de bandejas BeadChip y cargue los archivos del CD en el ordenador para cada lote nuevo.
4. Lea las bandejas HPA BeadChip con el sistema de obtención de imágenes de la matriz AIS 400 de BioArray. Procese los datos de BeadChip con el programa informático de análisis de HPA de BASIS.
5. Apague correctamente el AISR y la fuente de luz después de su uso.
6. Pase a BASIS para realizar la asociación de muestras y generar informes de BeadChip.


HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Socio Gerente



VIII. RESULTADOS ESPERADOS

A. Evaluación: Control de calidad

Incluya un control negativo (sin nucleasa H₂O) en cada prueba. Se recomienda la inclusión de un control positivo como una muestra con un genotipo conocido.

El control negativo se suministra con el kit HPA BeadChip. La finalidad de este control es identificar la contaminación por ADN genómico (ADNg) en una cantidad suficiente como para modificar los resultados del análisis. Menos de once resultados (LS o señal baja) de la muestra de control negativo en el informe de fenotipos, indica una posible contaminación por ADNg en una cantidad que puede tener consecuencias en los resultados del ensayo. Cuando esto se produce, ningún resultado de ninguna de las muestras del proceso es válido y las pruebas deben repetirse.

B. Análisis de los resultados

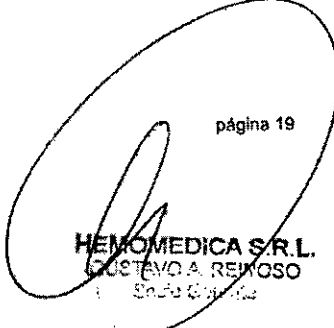
Se trata de un test cualitativo. El Sistema de información de soluciones BioArray (BASIS™) compara los datos de intensidad de la señal de la matriz BeadChip™ con la ubicación de los alelos emparejados específicos para determinar la presencia o ausencia de cada alelo.

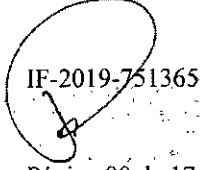
Todos los cálculos se realizan mediante el Software de Análisis HPA de BioArray Solutions en el Sistema de Información de BioArray Solutions (BASIS™).

Los siguientes mensajes pueden aparecer para resultados individuales de alelos si se produce la situación mencionada:

296

Advertencia	Significado	Explicación
LS	Señal baja [Low Signal]	<p>Indica que la intensidad de señal de un alelo específico es demasiado baja. No se puede completar el análisis de este alelo. No se deben emplear los resultados para este chip.</p> <p>Si se produce este mensaje: Repita el análisis y preste especial atención a la manipulación de los reactivos y la técnica de pipeteo. Si persiste el mensaje de advertencia, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica o el distribuidor de BioArray Solutions con el fin de obtener asistencia técnica.</p> <p>Tenga en cuenta que los resultados LS se esperan para muestras de testigo negativo (sin nucleasa H2O); se debe informar de once o más sondas como LS para que la prueba realizada se considere válida (consulte Evaluación: Control de calidad arriba).</p>
HB	Fondo elevado [High Background]	<p>Indica que la intensidad de fondo es demasiado elevada para el BeadChip individual. No se han notificado resultados para esta muestra.</p> <p>Repita el análisis y preste especial atención al manejo de reactivos y la técnica del cuentagotas y limpieza de BeadChip.</p> <p>Si persiste el mensaje de advertencia, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica o distribuidor de BioArray Solutions para obtener asistencia técnica.</p>
IC	Tipificación indeterminada [Indeterminate Call]	<p>Indica que el estado del antígeno específico no se puede determinar debido a una señal equivocada. Repita el ensayo desde el paso Procesamiento post-pcr; tratamiento con amplicones usando el producto PCR almacenado a una temperatura de entre -20 y -80 °C.</p> <p>Si persiste el mensaje de advertencia, repita la prueba desde la amplificación PCR usando el producto PCR preparado y almacenado a una temperatura de entre -20 y -80 °C.</p> <p>Si persiste el mensaje de advertencia, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica o el distribuidor de BioArray Solutions para obtener asistencia técnica. Se pueden considerar válidos +/- resultados informados para los demás fenotipos de antígenos si son consistentes en las pruebas repetidas.</p>


HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Suporte Técnico


 IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
 Página 90 de 174

Advertencia	Significado	Explicación
CV	Coeficiente de variación [Coefficient of Variation]	<p>Indica que la variación de intensidad en ciertas sondas es demasiado elevada. No se han notificado resultados para esta muestra.</p> <p>Repita el análisis y preste especial atención a la manipulación de los reactivos y la técnica de pipeteo.</p> <p>Si persiste el mensaje de advertencia, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica o el distribuidor de BioArray Solutions para obtener asistencia técnica.</p>



IX. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Esta versión para IVD del kit HPA BeadChip no está disponible para utilización comercial en Estados Unidos.

Al igual que con otros métodos basados en el ADN, en casos muy infrecuentes, cuando una muestra contiene un antígeno silenciado por una mutación de división o estructura, o por la ausencia de parte del gen que no incluye el cebador o el sitio de SNP, se puede obtener un falso positivo en el resultado de fenotipo. De forma similar, una mutación inesperada rara en los sitios de unión de oligonucleótido puede provocar un falso negativo en la tipificación.

El fallo en el ensayo puede deberse a causas sistémicas generales o causas individuales de la muestra. En el caso de que se produzca un fallo en la prueba, utilice el procedimiento de laboratorio estándar para evaluar el fallo y volver a realizar la prueba. La evaluación del material de ADN debe realizarse mediante electroforesis a través de un procedimiento adecuado. Se deberían generar los siguientes amplicones en la PCR:

Antígeno HPA	Tamaño	Antígeno	Tamaño
HPA-1	116	HPA-6	180
HPA-2	239	HPA-7	158
HPA-3,9	172	HPA-8,11	239
HPA-4	155	HPA-15	179
HPA-5	155		

Una cantidad insuficiente de ADN puede ofrecer una señal baja o resultados de llamada indeterminados. La cantidad recomendada de ADN a emplear en este proceso es ≥ 80 ng ($8 \mu\text{L}$ a una concentración de ≥ 10 ng/ μL).

Una pureza inadecuada puede afectar de forma negativa al proceso y a sus resultados. El ADN debe tener un índice de pureza (cociente de extinción $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) entre 1,50 y 1,95.

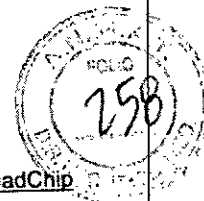
La presencia de heparina o citrato inhibe potencialmente la PCR¹³. La transferencia de heparina o citrato en el ADN empleado para la PCR puede, con toda probabilidad, provocar señales bajas o llamadas indeterminadas.

X. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Los resultados obtenidos por la evaluación clínica de funcionamiento muestran que el kit HPA BeadChip™ es un producto seguro y eficaz para la determinación de las variantes alélicas que indican los tipos de antígenos plaquetarios HPA 1-9,11 y 15.

Antígeno	Positivos	Sensibilidad	VPN	Negativos	Especificidad	VPP
HPA-1a	420	97,9 %*	92,4 %*	110	100 %	100 %
HPA-1b	266	100 %	100 %	264	100 %	100 %
HPA-2a	514	100 %	100 %	16	100 %	100 %
HPA-2b	136	100 %	100 %	394	100 %	100 %
HPA-3a	459	100 %	100 %	71	100 %	100 %
HPA-3b	323	100 %	100 %	207	100 %	100 %
HPA-4a	477	100 %	100 %	0	N.D.	N.D.
HPA-4b	1	100 %	100 %	476	100 %	100 %
HPA-5a	504	100 %	100 %	26	100 %	100 %
HPA-5b	133	100 %	100 %	397	100 %	100 %
HPA-6a	276	100 %	100 %	0	N.D.	N.D.
HPA-6bw	6	100 %	100 %	270	100 %	100 %
HPA-7a	276	100 %	100 %	0	N.D.	100 %
HPA-7b	0	N.D.	N.D.	276	100 %	100 %
HPA-8a	276	100 %	100 %	0	N.D.	N.D.
HPA-8b	0	N.D.	N.D.	276	100 %	100 %
HPA-9a	276	100 %	100 %	0	N.D.	N.D.
HPA-9b	4	100 %	100 %	274	100 %	100 %
HPA-11a	276	100 %	100 %	0	N.D.	N.D.
HPA-11b	0	N.D.	N.D.	276	100 %	100 %
HPA-15a	377	100 %	100 %	110	100 %	100 %
HPA-15b	334	98,5 %*	95,9 %*	153	100 %	100 %

*Estas cifras hacen referencia a 126 muestras procesadas en septiembre de 2009 mediante HPA BeadChip (n.º de lote 09-237), donde se incluyó la mezcla de cebadores revisada descrita en la sección de discrepancias que se puede ver más abajo. Estas muestras se incluyeron en pruebas anteriores, donde se obtuvieron resultados de falsos negativos para HPA-1a y HPA-15b. Con el lote 09-237, el kit demostró unos valores del 100 % en cuanto a



HPA de Immucor: Ensayo Molecular BeadChip

sensibilidad y VPN para estos antígenos; no se observaron cambios en los resultados relativos a los demás antígenos.

El kit de reactivos se probó en paralelo con métodos basados en ADN establecidos y una correlación del 100 % con el producto comparado.

Definiciones de las especificaciones técnicas comunes (CTS).

Sensibilidad de diagnóstico: La probabilidad de que el dispositivo ofrezca un resultado positivo en presencia del marcador objetivo.

Especificidad del diagnóstico: La probabilidad de que el dispositivo ofrezca un resultado negativo en ausencia del marcador objetivo.

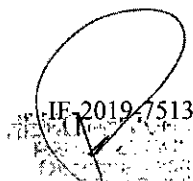
Antes de su distribución, cada lote del kit HPA BeadChip™ se prueba mediante el método de inserción frente a ADN previamente caracterizado para asegurar una reactividad y una especificidad adecuadas. El funcionamiento de estos productos depende del seguimiento de los métodos recomendados que se encuentran en este prospecto. Podrá consultarse toda la información adicional sobre las pruebas de especificidad realizadas en el momento de su fabricación o tras el lanzamiento del producto al mercado previa solicitud a los servicios técnicos de BioArray en el número de teléfono (+1) 908 226-8200 o mediante correo electrónico: BASCustomerServiceNJ@immucor.com.

N.º ref. 190-10204-ES Rev. E

página 23

Fecha de revisión 04-2016


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente


IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

Página 94 de 174

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Newman P, Derbes R, Aster R, J. Clin. Invest., Vol 83, May 1989, 1778-1781.
2. Kuijpers R, Faber N, Cuypers H, Ouwehand W, von dem Borne, J. Clin. Invest., Vol 89, Feb 1992, 381-384.
3. Lyman S, Aster R, Visentin G, Newman P, Blood, Vol 75, No 12, Jun 1990, 2343-2348.
4. Wang R, Furihata K, McFarland J, Friedman K, Aster R, Newman P, J. Clin. Invest., Vol 90, Nov 1992, 2038-2043.
5. Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newman P, J. Clin. Invest., Vol 92, Nov 1993, 2427-2432.
6. Wang R, McFarland J, Kekomaki R, Newman P, Blood, Vol 82, No 11, Dec 1993, 3386-3391.
7. Kuijpers R, Simsek S, Faber N, Goldschmeding R, van Wermerkerken R, von dem Borne, Blood, Vol 81, No 1 Jan 1993, 70-76.
8. Santoso S, Kalb R, Kroll H, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newman P. J Biol Chem., Vol 269, No 11, Mar 1994, 8439-44.
9. Noris P, Simsek S, de Bruijne-Admiraal L, Porcelijn L, Huiskes E, van der Vlist G, van Leeuwen F, van der Schoot C, von dem Borne A, Blood, Vol 86, No 3, Aug 1995, 1019-1026.
10. Simsek S, Folman C, van der Schoot CE, von dem Borne AE., Br j Haematol. Vol 97, No 2, May 1997, 330-5.
11. Schuh A, Watkins N, Nguyen Q, Harmer N, Lin M, Prosper J, Campbell K, Sutherland D, Metcalfe P, Horsfall W, Ouwehand W, Blood, Vol 99, No 5, Mar 2002, 1692-1698.
12. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, De Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J, Kiefel V, Santoso S. Vox Sanguinis. Vol 85, No 3, Oct 2003, 240-245.
13. García M, Blanco J, Caballero J, Gargallo-Viola D. Journal of Clinical Microbiology. Vol 40, No 4, Apr 2002, 1567-1568.



Patentes

Todos los bienes y servicios se venden sujetos a las cláusulas de ventas de BioArray Solutions Ltd. y están cubiertos por uno o más de los siguientes números de patente: 6,797,524; 7,427,512; 7,335,153; 7,390,676; EP1311839B1 (pendiente de patentes adicionales).

La compra de este producto otorga al comprador derechos bajo determinadas patentes de Roche para utilizarlas únicamente con el fin de proporcionar servicios de diagnóstico *in-vitro* para personas. La compra no concede ninguna patente general ni ningún otro tipo de licencia distintas de este derecho de uso concreto.

Este producto y su empleo están cubiertos por una o más de las patentes siguientes: EP 0 820 524, U.S. 6,150,095, 6,307,039, 6,770,751 y 7,192,707, Jap 2006 246897 y patentes pendientes. El comprador sólo recibe una licencia para practicar los métodos y procesos cubiertos por estas patentes cuando utilice este producto únicamente en aplicaciones de inmunohematología molecular.

La polimerasa Thermo Sequenase® DNA Polymerase de este producto está cubierta por la patente de Estados Unidos 5,614,365 y equivalentes extranjeras propiedad de la Universidad de Harvard y con licencia exclusiva para GE Healthcare, así como por la patente de Estados Unidos 5,885,813 y equivalentes extranjeras propiedad de GE Healthcare. Solo para uso en investigación (no se incluye la investigación *in-vivo*) o para uso diagnóstico comercial *in-vitro*. No debe utilizarse en aplicaciones terapéuticas o *in-vivo*. Otros usos exigen licencias que pueden adquirirse de GE Healthcare Bio-Sciences Corp.

Marcas comerciales

BeadChip, AIS, BASIS e eMAP son marcas comerciales de BioArray Solutions Ltd.

HotStarTaq DNA Polymerase®, QIAcube, QIAamp y QIAGEN son marcas comerciales registradas de QIAGEN GmbH, Hilden (Alemania).

Veriti y GeneAmp son marcas comerciales registradas de Life Technologies Corporation.

DNA AWAY es una marca comercial de Molecular BioProducts, Inc.

InSlide Out es una marca comercial registrada de Boekel Scientific

MiniMouse II es una marca comercial de Denville Scientific Inc.

MicroAmp es una marca comercial registrada de Applied Biosystems

Excel es una marca comercial registrada de Microsoft Corporation

Thermo Sequenase es una marca comercial registrada de GE Healthcare UK Limited.

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, aunque no aparezcan específicamente con la marca correspondiente, no se consideran desprotegidos por la ley.

Fabricante:

BioArray Solutions, Ltd.
35 Technology Drive, Suite 100
Warren, NJ 07059 EE. UU.
Teléfono (+1) 908 226-8200
Fax (+1) 908 226-0800

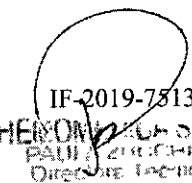
BASCustomerServiceNJ@immucor.com
<http://www.immucor.com>

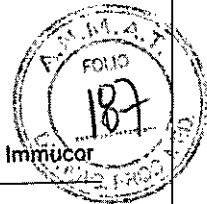
N.º ref. 190-10204-ES Rev. E

Fecha de revisión 04-2016

página 25


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente


IF-2019-78136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PALOMA ZIRCCHIN
Directora Técnica
Página 96 de 174



Test Molecular RHCE BeadChip de Immucor

IMMUCOR

RHCE de Immucor

TEST MOLECULAR BEADCHIP



BioArray Solutions Ltd.
35 Technology Drive, Suite 100
Warren, NJ 07059 EE. UU.



Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Adam-Opel-Strasse 26 A
63322 Rödermark (ALEMANIA)



N.º ref. 190-10307-ES D

Fecha de revisión: OCTUBRE de 2015

Página 1

HEMO MEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REJOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMO MEDICA S.R.L.
PAOLA ZUCCHINI
Directora Técnica
Página 97 de 174

Índice

I.	INTRODUCCIÓN	3
A.	Usó previsto.....	3
B.	Resumen del test.....	3
C.	Descripción del producto.....	4
II.	CONTENIDO DEL KIT BEADCHIP, EQUIPO Y SUMINISTROS NECESARIOS	6
A.	Contenido del kit RHCE (800-10206-48).....	6
B.	Equipo necesario.....	6
C.	Equipo recomendado.....	7
D.	Suministros necesarios.....	8
III.	DEFINICIÓN DE SÍMBOLOS	9
IV.	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	9
V.	TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD	11
VI.	EXTRACCIÓN DE MUESTRAS	12
VII.	PROCEDIMIENTO	12
A.	Verifique la configuración del programa del termociclador Veriti.....	12
B.	Notas acerca del procedimiento.....	13
C.	Preparación de la mezcla maestra para RCP.....	15
D.	Adición de muestra de ADN.....	17
E.	Amplificación de la PCR.....	18
F.	Procesamiento post PCR: Lavado.....	19
G.	Procesamiento post PCR: Generación de la Diana Monocatenaria.....	22
H.	Elongación en la matriz BeadChip.....	24
I.	Adquisición de imágenes de BeadChip.....	27
VIII.	RESULTADOS ESPERADOS	28
A.	Control de calidad.....	28
B.	Análisis de los resultados.....	29
IX.	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	33
X.	CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO	35
A.	Reproducibilidad.....	36
B.	Tests para las sustancias de interferencia.....	37
XI.	BIBLIOGRAFÍA	38



Kit RHCE BeadChip

I. INTRODUCCIÓN

A. Uso previsto

El kit RHCE BeadChip es un test cualitativo de diagnóstico *in vitro* diseñado para la determinación molecular de los antígenos RHCE C, c, E, e y variantes clínicamente significativas mediante el análisis genómico del ADN. Se trata de una herramienta de investigación para el análisis del RHCE y debe utilizarse junto con los métodos rutinarios empleados para la determinación del estado de Rh.

B. Resumen del test

El kit RHCE BeadChip usa la tecnología patentada de Análisis Multiplexado de Polimorfismos mediado por Elongación (eMAP[®]) para identificar la presencia o ausencia de los alelos seleccionados asociados a un fenotipo determinado. El ADN genómico se extrae de la sangre total y la PCR multiplexada amplifica los fragmentos de interés del gen RHCE. Tras la amplificación y el procesamiento post-PCR con reactivo Clean-up y Lambda Exonucleasa, los amplicones monocatenarios resultantes se mezclan con el reactivo eMAP y se incuban en la matriz de BeadChip, lo que les permite la hibridación con las sondas específicas de RHCE correspondientes. Una correspondencia exacta entre el extremo 3' de la sonda y el ADN hibridado activa una reacción de elongación en la que se extenderá la sonda mediante la incorporación de moléculas dCTP marcadas con fluorescencia. Si no hay una correspondencia exacta, la elongación no se producirá. Los productos de elongación de los alelos A y B se detectan de forma simultánea mediante imágenes de toda la matriz.

En este método, cada sonda se une mediante enlaces covalentes a un tipo de microesfera distinguible espectralmente. Una biblioteca de tipos de microesferas individuales contiene todas las sondas de interés. La biblioteca se inmoviliza en la matriz de BeadChip, lo que permite la detección simultánea de los polimorfismos de interés.

Los BeadChips se leen con el sistema de obtención de imágenes de la matriz (Array Imaging System, AIS[™] 400) de BioArray Solutions y el sistema de información de BioArray (BioArray Solutions Information System, BASIS[®]) genera resultados de análisis interpretados, estudiados y recogidos en un informe. El sistema AIS captura la señal fluorescente de las microesferas individuales en una imagen de toda la matriz para determinar la identidad de la microesfera por su color y su posición en la matriz. También detecta la intensidad media de la señal, la desviación estándar, el coeficiente de variación de las intensidades y el número de microesferas calculadas para cada tipo de sonda. A continuación, el programa informático BASIS importa la salida de intensidad bruta, evalúa la validez de los controles internos y genera resultados de análisis.

La frecuencia de los alelos usada para generar el informe en este test se basa en un modelo que refleja la población de Estados Unidos y tal vez no se aplique a grupos específicos de subpoblaciones.

C. Descripción del producto

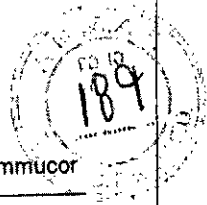
Los aloanticuerpos y autoanticuerpos dirigidos a los antígenos Rh humanos a menudo están asociados a la incompatibilidad de los antígenos RHCE y RHD codificados, así como a la expresión alterada de los antígenos. Las transfusiones crónicas debidas a una anemia drepanocítica, una anemia hemolítica autoinmune, una anemia aplásica, así como un embarazo incompatible con RhCE, pueden conllevar complicaciones, como reacciones hemolíticas agudas, reacciones febriles no hemolíticas, reacciones alérgicas, reacciones anafilácticas, enfermedad hemolítica del recién nacido (HDN) y hemólisis intravascular potencialmente mortal [1]. En estos casos, los estudios demuestran la utilidad de reforzar el fenotipado serológico con análisis de ADN para identificar la presencia de antígenos del grupo sanguíneo [2, 3]. La detección de polimorfismo de nucleótido simple asociada a más de 40 alelos de RHCE diferentes permite la aplicación del análisis del ADN [4].

El kit de tests RHCE BeadChip utiliza 25 marcadores genéticos asociados a los antígenos RhCE (consulte la tabla 1) para realizar llamadas de variantes fenotípicas (tabla 2).

Tabla 1: Marcadores genéticos del Ensayo RHCE BeadChip

Aminoácido	Polimorfismo de nucleótidos	Aminoácido	Polimorfismo de nucleótidos
W16C	48 G>C	V223F	667 G>T
A36T	106 G>C	A226P	676 G>C
Q41R	122 A>G	Q233E	697 C>G
P103S	307 C>T	M238V	712 A>G
* 109Ins	Inserción de 109 bp en el intrón 2	L245V	733 C>G
R114W	340 C>T	V250M	748 G>A
L115R	344 T>G	dT744dC	744 T>C
S122L	365 C>T	A273V	818 C>T
T152N	455 C>A	I306V	916 A>G
R154T	461 G>C	G336C	1006 G>T
M167K	500 T>A	T342I	1025 C>T
G180R	538 G>C	Rh r ^S	Sec. cod. 5'UTR
R201T	602 G>C		

* 109Ins detecta la presencia o ausencia de "C" en las muestras. No es un marcador de "c".



El programa informático de interpretación BASIS RHCE informa de los principales alelos y variantes fenotípicas siguientes en el sistema RHCE.

Tabla 2: Variantes fenotípicas detectadas por el kit RHCE BeadChip

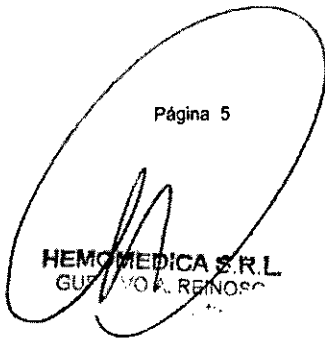
Nombre convencional (distingue entre mayúsculas y minúsculas)	Nombre ISBT [5]
WT(ce)	RHCE*01
WT(Ce)	RHCE*02
WT(cE)	RHCE*03
WT(CE)	RHCE*04
ce(48C)	RHCE*01.01
ceT1	RHCE*01.02
ce(1025T)	RHCE*01.03
AR	RHCE*01.04
ceEK	RHCE*01.05
ceMO	RHCE*01.07
ceBl o ceSM	RHCE*01.08 o RHCE*01.09
ceSL	RHCE*01.10
ceRT	RHCE*01.11
ceRA	RHCE*01.12
ce(733G)	RHCE*01.20.01
ce(48C,733G)	RHCE*01.20.02
ce(48C,733G,1006T) [§]	RHCE*01.20.03
ce(48C,733G,1025T)	RHCE*01.20.04
ce(733G,1006T) [§]	RHCE*01.20.05
ceCF	RHCE*01.20.06
ce(697G,733G)	
ceJAL	RHCE*01.20.07
ce(48C,340T,733G)	
ce(48C,733G,748A)	RHCE*01.20.08

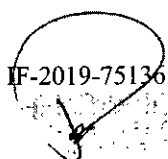
Nombre convencional (distingue entre mayúsculas y minúsculas)	Nombre ISBT [5]
ce(733G,748A)	
ceHAR	RHCE*01.22
CeMA	RHCE*02.01
CeFV	RHCE*02.02
Ce(365T)	RHCE*02.03
CeVA	RHCE*02.04
CeCW	RHCE*02.08.01
ce(48C,122G)	
CeCX	RHCE*02.09
ce(48C,106A)	
CeRN	RHCE*02.10.01
Ce(344G)	RHCE*02.12
cEEW	RHCE*03.01
cEFM	RHCE*03.03
cE(602C)	RHCE*03.04
cEKH	RHCE*03.05
cE(344C)	RHCE*03.07
(48C,712G,733G) [11]	
(340T,344G) [10]	
ce(48C,697G,733G,1006T) [§] [9]	
ce(48C,697G,712G,733G,916T) [12]	
ce(48C,733G,744C) [13]	
Ce(667T)	
cE(365T)	

Se recomienda el uso de la terminología de la Sociedad Internacional de Transfusión de Sangre (ISBT) [5] correspondiente cuando sea posible.

La presencia de alelos marcados con "§" puede sugerir la presencia del haplotipo (C)ces o r [6][7][8]. Para la confirmación, debe analizarse la muestra con el kit RHD BeadChip para comprobar la presencia de DIIIa-CE(4-7)-D.

Las tablas anteriores no incluyen en absoluto todas las posibles variaciones genéticas de RHCE. Consulte las variaciones de RHCE no cubiertas por este test en la sección "Limitaciones".


HEMOMEDICA S.R.L.
 GUAYMA, RINOSCO


 IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
 Página 101 de 174

II. CONTENIDO DEL KIT BEADCHIP, EQUIPO Y SUMINISTROS NECESARIOS

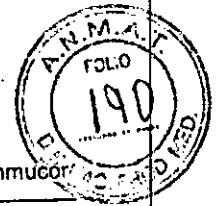
A. Contenido del kit RHCE (800-10206-48)

REF.	Descripción	Cantidad*
800-00216	Mezcla para RCP RHCE eMAP™	1 x 900 µl
800-10242	HotStarTaq DNA Polymerase	1 x 155 µl
800-00191	Clean-up Reagent	1 x 330 µl
800-00195	Lambda Exonuclease	1 x 330 µl
800-00193	eMAP™ Elongation Mix	1 x 600 µl
800-00287	Control negativo	1 x 1000 µl
830-00057	Bandeja de 8 BeadChip RHCE eMAP™	6 bandejas x 8 matrices de BeadChip
800-10282	CD de datos de bandejas de RHCE	1

*Los reactivos líquidos se han sobrellenado para garantizar que se recupere el total de la cantidad indicada.

B. Equipo necesario

Descripción	Número de catálogo
Sistema de Obtención de Imágenes de Matriz AIS 400	(BioArray) 790-10007, 790-20006, 790-20016
Horno de hibridación (incubación) (modelo Boekel InSlide-Out™)	(Boekel) 241000
Termociclador (Veriti de Applied Biosystems)	(Applied Biosystems) 4375786
Nevera (capacidad de mantener temperaturas de 2 a 8 °C)	-
Congelador sin formación de escarcha (capacidad para mantener temperaturas de -20 °C o menos)	-



C. Equipo recomendado

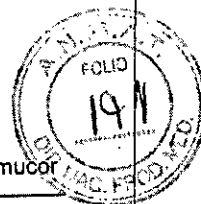
Descripción	Número de catálogo*
Criobloques (Denville o equivalente)	(Denville) R6670
Centrífuga de microplacas (Eppendorf modelo 5430 o equivalente)	(Fisher) 05-400-017
Gradillas de tubos para PCR (recomendadas Fisher Scientific o equivalentes)	(Fisher) 05-541-50
Campana para estación de trabajo de PCR con luz UV (recomendada CBS Scientific o equivalente)	(CBS Scientific) P-030-02
Pipetas de precisión, multicanal, capaces de suministrar de 0,5 a 10 µl (recomendadas Fisherbrand® o equivalentes) <ul style="list-style-type: none">• Exactitud +/- del 12 al 2,4 %• Precisión < 8 al 1,6 %	(Fisher) 21-377-825
Pipetas de precisión, multicanal, capaces de suministrar de 5 a 50 µl (recomendadas Fisherbrand® o equivalentes) <ul style="list-style-type: none">• Exactitud +/- del 5,0 al 1,5 %• Precisión < 2,0 al 0,7 %	(Fisher) 21-377-827
Pipetas de precisión, monocanal, capaces de suministrar de 0,5 a 10 µl (recomendadas Eppendorf o equivalentes) <ul style="list-style-type: none">• Exactitud +/- del 2,5 al 1 %• Precisión ≤ del 1,8 al 0,4 %	(Fisher) 13-684-250
Pipetas de precisión, monocanal, capaces de suministrar de 10 a 100 µl (recomendadas Eppendorf o equivalentes) <ul style="list-style-type: none">• Exactitud +/- del 3,0 al 0,8 %• Precisión ≤ del 1,0 al 0,2 %	(Fisher) 13-684-250
Pipetas de precisión, monocanal, capaces de suministrar de 100 a 1000 µl (recomendadas Eppendorf o equivalentes) <ul style="list-style-type: none">• Exactitud +/- del 3,0 al 0,6 %• Precisión ≤ del 0,6 al 0,2 %	(Fisher) 13-684-250
QIAGEN® Q!Acube®	(Qiagen) 9001292
Centrifugadora de tubos (Denville MiniMouse II™ o equivalente)	(Denville) C0801
Mezclador vorticial con adaptador para tubos y plano (recomendada Denville o equivalente)	(Denville) S7030

* Los números de referencia del fabricante de pipetas podrían cambiar. Consulte siempre la información descriptiva cuando solicite suministros si no está seguro de los números de catálogo.

D. Suministros necesarios


Descripción	Número de catálogo*
Tubos para centrifugadora de 1,5 ml (recomendados Eppendorf™ o equivalentes)	(Fisher) 05-402-24B
Tapones para tubos de termociclador de pared fina, de 0,2 ml, para tira de 8 tubos (Applied Biosystems o equivalente)	(Applied Biosystems) N8010535
Tubos de termociclador de pared fina, de 0,2 ml para tira de 8 tubos (Applied Biosystems o equivalente)	(Applied Biosystems) N8010580
Placa para PCR sin faldón de 96 pocillos de 0,2 ml (Fisherbrand® o equivalente)	(Fisher) 14230232
Agua para lavado BeadChip (recomendada Invitrogen)	(Invitrogen) 10977-023
Aire comprimido o encapsulado, sin aceite (recomendado Fisherbrand® o equivalente)	(Fisher) 23-022-523
Descontaminante (recomendado Molecular BioProducts™ DNA AWAY™ o equivalente)	(Fisher) 21-236-28
Kit de extracción de ADN (recomendado minikit de ADN sanguíneo QIAamp® DSP de QIAGEN® o equivalente)	(Qiagen) 61104
Puntas de pipeta con filtro desechables (resistentes a aerosoles) que cubren el intervalo de 0,1 µl a 1000 µl (recomendadas ePTIPS™ de Eppendorf™ con filtro o equivalentes)	(Fisher) 05-403-14 (Fisher) 05-403-18 (Fisher) 05-403-20
Precintos de placas para PCR (recomendado film adhesivo transparente MicroAmp® de Applied Biosystems® o equivalente)	(Applied Biosystems) 4306311
Papeles absorbentes de alta calidad multipliegue (recomendados Uline o equivalentes)	(Uline) S-7127

* Los números de referencia del fabricante podrían cambiar. Consulte siempre la información descriptiva cuando solicite suministros si no está seguro de los números de catálogo.



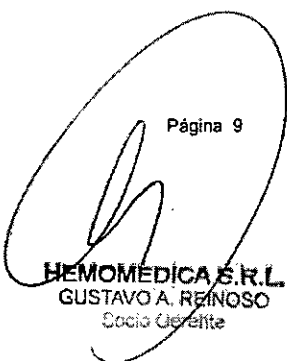
III. DEFINICIÓN DE SÍMBOLOS

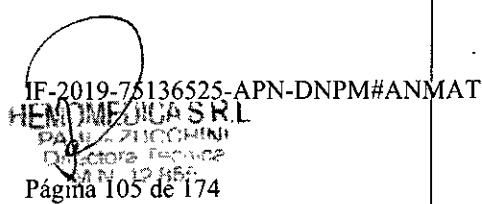
Se pueden encontrar los símbolos especiales siguientes en los componentes del kit RHCE BeadChip:

Símbolo	Definición
	CD que contiene archivos de datos e instrucciones de uso
CONT	Índice

IV. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Todas las muestras sanguíneas deben considerarse potencialmente infecciosas y manejarse aplicando precauciones universales. Use un equipo protector personal adecuado durante todo el análisis, incluidos guantes, protección ocular y bata de laboratorio. En caso de que se produzca contacto con los ojos, lávelos de forma inmediata con abundante agua y busque ayuda médica. Para más información acerca de la seguridad, consulte el sitio web: <http://extranet.immucor.com>
- Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de reactivos o muestras con la piel y membranas mucosas.
- Deseche los materiales usados de acuerdo con las normativas del centro o locales para la eliminación de materiales potencialmente biopeligrosos. Los derrames de material potencialmente infeccioso se deben limpiar y eliminar inmediatamente, con arreglo a las normas del centro y los procedimientos para la manipulación y eliminación de materiales potencialmente biopeligrosos.
- La tecnología de PCR es sensible a la contaminación, especialmente de sus propios productos. Los aerosoles de amplicones que se generan durante los pasos post RCP son una fuente frecuente de contaminación. Por lo tanto, se debe tener cuidado de evitar las salpicaduras excesivas y la generación de aerosoles. Durante el uso del kit, deben seguirse las buenas prácticas de laboratorio para los laboratorios moleculares, lo que incluye limpiar las superficies de trabajo antes del procesamiento o preparación de las muestras para PCR con lejía al 10 % recién preparada (o equivalente), aplicar luz ultravioleta (UV) en las campanas o armarios de seguridad biológica entre usos, separar en espacio y tiempo las actividades pre y post PCR, usar reactivos para PCR alicuotados en partes iguales, usar controles positivos y negativos, etc. El uso de una técnica constante y meticulosa, además de la libre incorporación y monitorización de controles, asegurarán un método vigilante y proactivo para el control y la prevención de la contaminación de la PCR.
- Los laboratorios deben validar sus propios procedimientos de limpieza.


HEMOMÉDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Socio Gerente


 IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMÉDICA S.R.L.
 PABLO ZUCCHINI
 Director Técnico
 SAN LUIS
 Página 105 de 174

- La contaminación de los reactivos o las muestras puede provocar resultados erróneos. Por lo tanto, tenga cuidado de evitar la contaminación de este producto durante su uso. No utilice reactivos si sospecha que puedan estar contaminados.
- La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede provocar resultados incorrectos.
- La muestra de control negativo de RHCE puede detectar niveles de ADN genómico contaminante de $\geq 2,5$ ng/reacción. Unos niveles de contaminación que no sean detectables mediante el control negativo no afectarán a los resultados de la muestra analizada.
- El incumplimiento de las directrices de uso recomendadas puede provocar un rendimiento no óptimo del producto. En función de la naturaleza y gravedad del incumplimiento, pueden producirse un fallo del análisis (muestra individual o fallos de la ejecución) o unos resultados erróneos.
- Use los reactivos del kit y las bandejas BeadChip tal como se suministran. Su dilución o alteración puede generar resultados erróneos.
- No mezcle reactivos ni bandejas BeadChip de lotes diferentes.
- No use frascos con fugas o no rotulados. La eliminación debe hacerse según las instrucciones anteriores.
- Las muestras o reactivos previamente congelados deben mezclarse bien y centrifugarse posteriormente después de descongelarlos y antes de las pruebas. Evite la generación de espuma y burbujas en las muestras.
- Mantenga todos los reactivos, incluidas las enzimas y las mezclas maestras, en hielo o criobloques (de 2 a 8 °C) durante su uso.
- El intervalo de concentración operativa de ADN del análisis RHCE BeadChip es de 10 a 80 ng/ μ l. El uso de concentraciones fuera de este intervalo puede provocar errores en los resultados de los alelos.
- Compruebe el correcto sellado de los tubos de muestras antes de la amplificación para impedir la evaporación durante los ciclos de variación térmica.
- A causa de las diferencias inherentes en los mecanismos de funcionamiento del termociclador, puede producirse una variación en los resultados al transferir perfiles térmicos establecidos entre diferentes marcas y modelos de instrumentos termocicladores. En algunos casos, esto puede afectar a la especificidad y a la sensibilidad de la reacción, lo que puede provocar una interpretación y comunicación falsas de los datos. Applied Biosystems Veriti es el termociclador recomendado para este análisis. Immucor no garantiza el rendimiento del análisis con el uso de termocicladores y perfiles alternativos, que debe validar el usuario.



- Durante el paso de elongación, las muestras deberán permanecer en el pocillo de reacción BeadChip, en la placa o en el portaobjetos.
- Los tiempos de incubación y las temperaturas distintas a las especificadas pueden dar resultados erróneos.
- Cada día de uso, antes de utilizar el AIS 400, los usuarios deberán realizar el procedimiento del test de exposición (ETC) para verificar el rendimiento del AIS. Si el test de exposición resulta fallido, póngase en contacto con el servicio técnico para obtener las instrucciones adecuadas.
- Algunas sondas que aparecen en la tabla de resultados son complementarias y no se utilizan en el análisis. La validez del procesado y de la muestra solo deberá basarse en los datos que aparecen en la columna "MenAdv" (WarnMsg) de la tabla "Asignación de tipificaciones wRHCE" (wRHCE Typing Assignment) en BASIS.

V. TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los reactivos del kit RHCE BeadChip, incluidas la mezcla de cebadores y todas las enzimas, se transportan en hielo seco. Cuando reciba el kit, compruebe que quede hielo seco en el envase. Si no hay hielo, no utilice el kit y póngase en contacto con el representante del servicio al cliente. Asimismo, póngase en contacto con el representante del servicio al cliente si la bolsa de la bandeja BeadChip sellada al vacío se ha abierto o dañado durante el transporte.

Conserve todos los reactivos del test, incluidas la mezcla de cebadores y todas las enzimas, a una temperatura de -20 a -80 °C, en un congelador sin formación de escarcha. Utilice criobloques de sobremesa o hielo cuando sea posible.

Guarde las bandejas BeadChip a una temperatura de 2-8 °C hasta su uso. Las bandejas sin usar deben devolverse de forma inmediata a su almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C en su envase original. Las bandejas BeadChip no se pueden reutilizar.

Consulte la fecha de caducidad de todos los componentes del kit. No utilizar después de la fecha de caducidad. El formato de la fecha de caducidad es AAAA-MM-DD. Los componentes de este kit pueden presentar una fecha de caducidad mayor que la fecha de caducidad de todo el kit. La vida útil más corta (esto es, la fecha de caducidad más temprana) de cualquier componente del kit se indica en la etiqueta externa del kit.

VI. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Muestra: las muestras de sangre deberán extraerse a tubos con anticoagulante EDTA (números de producto BD 366643, 368661, 367654).

Se recomienda extraer las muestras de ADN con ayuda del minikit de sangre de ADN QIAamp DSP (QIAGEN n.º de cat. 61104), de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. El uso de otros procedimientos requiere la validación del cliente.

Conservación: el ADN genómico debe conservarse a -20 °C o menos, en un congelador sin formación de escarcha, hasta su uso. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.

Sustancias interferentes: la presencia de inhibidores de la PCR, como el citrato [14], la heparina [14], la hemoglobina, el etanol, etc., puede interferir en la PCR.

Cantidad de ADN: se requiere una concentración de 10 a 80 ng/µl de ADN genómico extraído para un rendimiento óptimo del kit RHCE BeadChip. Use agua sin nucleasa para diluir muestras de ADN con una concentración superior a 80 ng/µl a unos límites entre 10 y 80 ng/µl.

VII. PROCEDIMIENTO

A. Verifique la configuración del programa del termociclador Veriti.

Asegúrese de que la opción de tapa calefactada esté seleccionada para los tres programas siguientes.

Programa PCR RHCE:

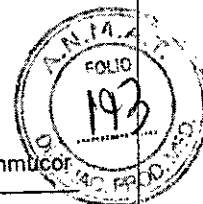
95 °C	15 min		
94 °C	30 s	Desnivel del 39 %	} 10 ciclos
65 °C	45 s	Desnivel del 39 %	
72 °C	45 s	Desnivel del 39 %	
94 °C	30 s	Desnivel del 39 %	} 25 ciclos
61 °C	45 s	Desnivel del 39 %	
72 °C	45 s	Desnivel del 39 %	
72 °C	3 min		
4 °C	∞ (hasta 72 horas)		

Programa RHCE Clean-Up:

37 °C	15 min
85 °C	20 min
4 °C	∞ (hasta 3 horas)

Programa RHCE Lambda:

37 °C	20 min
85 °C	8 min
4 °C	∞ (hasta 3 horas)



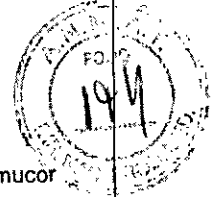
B. Notas acerca del procedimiento

- Para reducir o eliminar la posibilidad de contaminación por arrastre, los usuarios asignarán tres (3) áreas separadas: (1) actividades de configuración/antes de la PCR, (2) adición de ADN y (3) procedimientos después de la PCR.
- Los pasos de la sección C, "Preparación de la mezcla maestra para RCP", deberá realizarse en el área para antes de la RCP, dentro de la campana para estación de trabajo de RCP o en una sala limpia, con puntas de pipeta (con filtro) resistentes a aerosoles.
- Los pasos de la sección D, "Paso de adición de ADN", deberán realizarse en el área de adición de ADN, dentro de una campana especializada, con puntas de pipeta (con filtro) resistentes a aerosoles.
- El resto del procedimiento tras la sección E, "Amplificación de la RCP", deberá realizarse en el área para después de la RCP.
- Antes de usarlas, limpie las superficies del área de procesamiento con lejía al 10 % o DNA AWAY, lo que incluye:
 - las superficies de la sobremesa y del interior de la campana,
 - el equipo de apoyo,
 - todas las pipetas de trabajo, monocanal y multicanal,
 - el interior de la tapa de la centrifugadora MiniMouse, las gradillas de los tubos y las cubiertas (siga las instrucciones del fabricante),
 - las superficies del termociclador y de la centrifugadora de placas (siga las instrucciones del fabricante para limpiar el interior de la tapa y los pocillos de la placa del termociclador),
 - el interior de la tapa y los pocillos de la placa del termociclador con DNA AWAY (o equivalente) y enjuague con agua desionizada.
- Antes de usar la campana, encienda la luz UV durante un mínimo de entre 15 y 20 minutos.
- Extraiga las cantidades necesarias de reactivos, muestras y controles del almacenamiento y, si están congelados, deje que se descongelen antes de su uso. Vuelva a guardar adecuadamente y de inmediato las partes no utilizadas.
- Utilice puntas de pipeta con filtro desechables (resistentes a aerosoles) para todos los pasos del procedimiento.
- Deben emplearse pipetas multicanal o monocanal, en función de las preferencias del laboratorio. Todas las pipetas empleadas deben calibrarse. La cantidad de reactivos suministrados con cada kit BeadChip es suficiente para pipetear las cantidades sugeridas en este procedimiento. El pipeteo preciso de muestras y reactivos es necesario para obtener unos resultados precisos.
- Tenga cuidado de mezclar las muestras y los reactivos de forma adecuada. Evite la formación de espuma.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Directora Técnica

IP-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
Directora Técnica
M. 12.855

- Combine los reactivos de trabajo justo antes de su uso.
- Mantenga todos los reactivos en hielo o en criobloque (de 2 a 8 °C) hasta su uso.
- Asegúrese de que el termociclador Veriti esté programado previamente para cada uno de los pasos de amplificación de la RCP, procesamiento después de la RCP, tratamiento con amplicones y generación de diana monocatenaria. Antes de cada paso, asegúrese de que ha seleccionado el perfil preprogramado adecuado.
- Extraiga las bandejas BeadChip del almacenamiento y espere a que alcancen la temperatura ambiente antes de usarlas (normalmente tardan entre 15 y 20 minutos).
- Es sumamente importante evitar la contaminación cruzada entre los pocillos BeadChip. Tenga cuidado al pipetear, enjuagar y eliminar los líquidos.
- El sistema de obtención de imágenes de la matriz AIS 400 de BioArray Solutions y el incubador de hibridación (Boekel InSlide-Out modelo 241000) deben encenderse al menos 30 minutos antes de su funcionamiento. Coloque dos papeles absorbentes en la bandeja del incubador de hibridación y satúrelos con un total de 25 ml de agua desionizada para mantener las condiciones de humedad durante la incubación. Si el incubador de hibridación se ha usado anteriormente durante el día, deseche los papeles absorbentes usados, coloque dos papeles nuevos y satúrelos como antes, con un total de 25 ml de agua desionizada.



C. Preparación de la mezcla maestra para RCP

Medidas preventivas

- Prepare siempre la mezcla maestra para PCR dentro de una campana de trabajo para PCR o una sala limpia con el fin de evitar la contaminación cruzada (la muestra de ADN deberá añadirse fuera de la campana).
- Una vez preparada, la mezcla maestra para PCR de trabajo deberá utilizarse de inmediato, pero puede mantenerse en un criobloque (conservada a entre 2 y 8 °C) o en hielo durante un máximo de 15 minutos.
- La placa para PCR puede cortarse si van a analizarse menos de 96 muestras. Sin embargo, puede dejar una columna adicional vacía para evitar la evaporación debida al plástico agrietado o a un sellado incorrecto.
- No tarde más de unos 30 minutos en preparar la mezcla maestra y añadir el ADN.

Nota: Disponga las muestras y los testigos en el orden en el que se añadirán a la placa para PCR. Registre los ID de las muestras en el mapa de placas de muestras en el mismo orden. El mapa de la placa se utilizará posteriormente para la asociación de muestras (los mapas de muestras pueden crearse en Excel[®] o directamente en el programa informático BASIS).

Nota: En cada procesado, se requiere un control negativo (control sin ADN) suministrado con el kit. También se recomienda el uso de un control positivo con genotipo o fenotipo conocido para cada procesado.

Procedimiento de análisis

1. Preparación de reactivos y muestras

- 1.1 Extraiga la mezcla para PCR RHCE eMAP (tapón azul) del congelador a -20 °C y descongélela a temperatura ambiente durante un tiempo de hasta 30 minutos. Una vez descongelada, mantenga la mezcla de PCR RHCE en un criobloque (de 2 a 8 °C) o en hielo. Agite en una agitadora vorticial y centrifugue brevemente antes de su uso (unos 3-5 segundos).
- 1.2 Extraiga HotStarTaq DNA Polymerase (tapón naranja) del congelador a -20 °C y colóquela en un criobloque (2-8 °C) o en hielo. Agite en una agitadora vorticial y centrifugue brevemente antes de su uso (unos 3-5 segundos).
- 1.3 Deje que la muestra de ADN alcance la temperatura ambiente. Agite en una agitadora vorticial y centrifugue brevemente antes de su uso (unos 3-5 segundos).

2. Preparación de la mezcla maestra para PCR (en campana de trabajo para PCR o sala limpia)

- 2.1 Determine el número total de muestras y controles a procesar.

2.2 Etiquete un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml o 2,0 ml para la mezcla maestra para PCR.

2.3 Prepare la mezcla maestra para PCR en el tubo de microcentrifuga con los volúmenes de la tabla 3. Devuelva los reactivos al almacenamiento adecuado inmediatamente después de su uso.

Tabla 3: Preparación de la mezcla maestra para PCR: volúmenes de los reactivos

N.º muestra	1	8	16	24	32	40	48
Mezcla para PCR RHCE eMAP (µl)	16	144	296	448	592	736	880
HotStarTaq DNA Polymerase (µl)	1,0	9,0	18,5	28,0	37,0	46,0	55,0

La tabla está diseñada como una guía y proporciona aproximadamente entre el 10 y el 20 % más de reactivo de trabajo que el necesario para realizar el análisis.

2.3.1 Dispense la cantidad de mezcla para PCR RHCE eMAP en el tubo de microcentrifuga etiquetado con una pipeta monocal. *Sumerja la punta de la pipeta con filtro lentamente en el frasco de reactivo de la mezcla para PCR con el fin de evitar el desbordamiento y el derramamiento.*

2.3.2 Dispense la cantidad adecuada de HotStarTaq en el tubo con mezcla para PCR con una pipeta monocal. **Mezcle tres veces.** Devuelva los reactivos al criobloque (de 2 a 8 °C), al hielo o al congelador inmediatamente después de su uso.

2.3.3 Fije el tapón del tubo de la mezcla maestra para PCR, agite en la agitadora vortical y centrifugue brevemente (entre 3 y 5 segundos aproximadamente). Manténgala en un criobloque (de 2 a 8 °C) o en hielo hasta su uso.

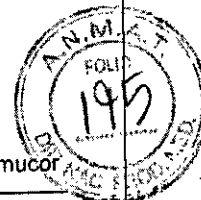
2.4 Dispense la cantidad de mezcla maestra para PCR en una tira de 8 tubos de acuerdo con los volúmenes de la tabla siguiente e inspeccione de forma visual cada tubo. Manténgala en hielo o en criobloque (de 2 a 8 °C) hasta su uso.

Tabla 4: Mezcla maestra para PCR de trabajo: volúmenes de transferencia

Hasta la muestra n.º	8	16	24	32	40	48
Volumen de mezcla maestra para PCR (ul)	Añada 17 µl directamente a la placa post PCR	37,0	57,0	76,0	94,0	112,0

2.5 Prepare la placa de 96 pocillos para PCR y etiquétela de forma adecuada.

2.6 Dispense **17.0 ul** de mezcla maestra para PCR en el fondo de cada pocillo de la placa para PCR etiquetada en un criobloque (de 2 a 8 °C) o en hielo (puede utilizarse una pipeta de 8 canales). Deseche la mezcla maestra para PCR no utilizada.



D. Adición de muestra de ADN

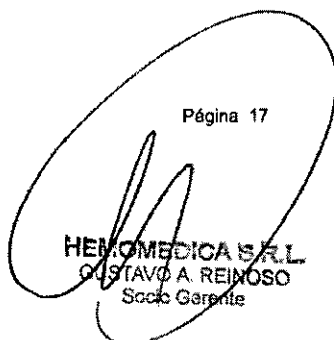
Medidas preventivas

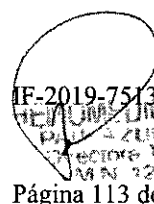
- Encienda el termociclador Veriti aproximadamente 10 minutos antes de iniciar el ciclo de PCR.
- Añada el ADN y los testigos a la mezcla maestra para RCP fuera de la campana lo antes posible, pero en los 15-20 minutos siguientes.
- Mantenga la muestra y la mezcla maestra para PCR de trabajo en un criobloque (conservadas a entre 2 y 8 °C) o en hielo durante estos pasos.

Nota: Compruebe el orden de las muestras y la identificación en el mapa de placas de muestras.

Procedimiento de análisis

1. Si todavía no lo ha hecho, agite en una agitadora vorticial y centrifugue la muestra de ADN.
2. Añada **8.0 µl** del control negativo necesario (suministrado en la caja del kit de reactivos RHCE) en el pocillo adecuado de la placa para PCR con una pipeta monocanal.
3. Opcional: añada **8.0 µl** del control positivo recomendado con genotipo o fenotipo conocido en los pocillos adecuados de la placa para PCR con una pipeta monocanal.
4. Añada **8.0 µl** de cada muestra de ADN en los pocillos adecuados de la placa para PCR con una pipeta adecuada. Mezcle tres veces por aspiración de pipeta para garantizar una transferencia completa de ADN.
5. Selle la placa para PCR de forma segura con precinto adhesivo térmico para placas. Asegúrese de que todos los pocillos estén completamente cerrados para evitar la evaporación.
6. Mezcle con cuidado agitando en agitadora vorticial durante unos **3-5 segundos**.
7. Centrifugue brevemente a unas 1000 rpm para que las muestras se posen en el fondo de los pocillos.


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente


IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente
Página 113 de 174

E. Amplificación de la PCR

Medidas preventivas

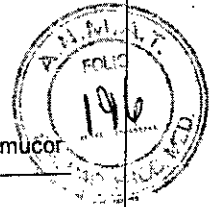
- Las muestras amplificadas centrifugadas y los controles deberán usarse de inmediato, pero pueden conservarse a una temperatura de -20 °C (o menos) durante un periodo de hasta cuatro semanas.

Procedimiento de análisis

- Coloque la placa para PCR en el centro del termociclador.
- Cierre la tapa y empuje la manilla hacia abajo.
- Inicie sesión en el termociclador y seleccione "Examinar/Nuevos métodos" (Browse/New Methods).
- Seleccione el programa RCP RHCE (RHCE PCR) y pulse "Ver" (View) para verificar que el programa es correcto:

Ciclos	1	10				25			1	1
Temp. (°C)	95 °C	94 °C	65 °C	72 °C	94 °C	61 °C	72 °C	72 °C	4 °C	
Tiempo	15 min	30 s	45 s	45 s	30 s	45 s	45 s	3 min	Hasta extracción (no más de 72 horas)	
Desnivel	100 %	39 %	39 %	39 %	39 %	39 %	39 %	100 %	100 %	

- Pulse "Ejecutar" (Run). El volumen de reacción deberá ser **25.0 µl**. Deje que la tapa calefactada funcione a una temperatura establecida a 105 °C.
- Pulse "Iniciar procesado ahora" (Start Run Now) para iniciar el proceso y compruebe que la tapa se esté calentando y el programa se haya iniciado.
- Extraiga la placa para PCR del termociclador cuando el programa haya alcanzado 4 °C y centrifugue brevemente (a aproximadamente 1000 rpm durante 5 segundos). La placa para PCR deberá extraerse del termociclador a 4 °C en las 72 horas siguientes.



F. Procesamiento post PCR: Lavado

Medidas preventivas

- Los pasos de la sección F deberán realizarse de forma continua sin interrupción en el área para después de la PCR.
- El Clean-up Reagent deberá añadirse al producto después de la PCR en el plazo de unos 30 minutos aproximadamente tras la extracción de los productos de la PCR del termociclador después de la amplificación de la PCR o, si están congelados, tras 30 minutos de descongelación.
- La placa para PCR puede cortarse si van a analizarse menos de 96 muestras. Sin embargo, puede dejar una columna adicional vacía para evitar la evaporación debida al plástico agrietado o a un sellado incorrecto.
- El Clean-up Reagent y el producto de la PCR deberán descongelarse a temperatura ambiente y conservarse en un criobloque (2-8 °C) o en hielo hasta su uso.
- Cuando transfiera el producto después de la PCR y el Clean-up Reagent a placas post PCR nuevas, manténgalos en un criobloque (conservados a 2-8 °C) o en hielo durante estos pasos.
- Las muestras lavadas centrifugadas y los controles deberán usarse de inmediato o conservarse a una temperatura de -20 °C (o menos) durante un período de hasta 24 horas.

Procedimiento de análisis

1. Extraiga el Clean-up Reagent (tapón verde) del congelador **10-15 minutos** antes de usarlo y colóquelo en un criobloque (2-8 °C) o hielo. Agite en una agitadora vorticial y centrifugue brevemente antes de su uso (unos 3-5 segundos).
2. Mezcle con cuidado y centrifugue (a proximadamente 1000 rpm durante 5 segundos) los productos de la PCR antes de usarlos. Colóquelos en un criobloque (2-8 °C) o hielo.
3. Determine el número total de muestras y controles a procesar.
4. Prepare una placa para PCR nueva para el procesamiento post PCR y etiquétela según corresponda.
5. Coloque la placa del producto de la PCR en la misma orientación que la placa post PCR en un criobloque (2-8 °C).
6. Transfiera **6.5 µl** de cada producto de la PCR al fondo del pocillo adecuado de la nueva placa para después de la PCR con una pipeta de 8 canales.
7. Selle la placa con los productos restantes de la PCR y almacénela en el congelador a **entre -20 y -80 °C** hasta que se haya completado correctamente el procesado de análisis.

N.º ref. 190-10307-ES D

Fecha de revisión: OCTUBRE de 2015

Página 19

HEMOMÉDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

PAUL ZUCCHINI
DIRECTOR TÉCNICO
10/11/2019 12:45+

Página 115 de 174

8. Con la tabla 5 como referencia para determinar el volumen adecuado, dispense el Clean-up Reagent en una cinta de 8 tubos con una pipeta monocal e inspeccione visualmente cada tubo. Devuelva los reactivos al almacenamiento adecuado inmediatamente después de su uso.

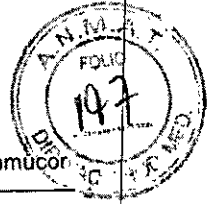
Tabla 5: Volúmenes de Clean-up Reagent

N.º muestra	8	16	24	32	40	48
Clean-up Reagent (µl)	Añada 2 µl directamente a la placa post PCR	6,0	9,0	12,0	14,0	16,0

9. Dispense **2.0 µl** de Clean-up Reagent en cada pocillo de la placa post PCR (puede usarse una pipeta de 8 canales). Mezcle bien tres veces mediante aspiración por pipeta.
10. Después de añadir el Clean-up Reagent a todos los pocillos de muestras de la placa post PCR, deseche la cinta de 8 tubos.
11. Selle la placa post PCR de forma segura con precinto adhesivo térmico para placas.
12. Mezcle con cuidado agitando en agitadora vorticial durante unos **3-5 segundos**.
13. Centrifugue brevemente a unas 1000 rpm para que las muestras se posen en el fondo de los pocillos.
14. Coloque la placa **post PCR** en el centro del termociclador.
15. Cierre la tapa y empuje la manilla hacia abajo.
16. Inicie sesión en el termociclador y seleccione "**Examinar/Nuevos métodos**" (**Browse/New Methods**).
17. Seleccione el programa **Lavado RHCE** (RHCE Clean-up) y pulse "**Ver**" (View) para verificar que el programa es correcto:

Ciclos	1	1	1
Temp. (°C)	37 °C	85 °C	4 °C
Tiempo	15 min	20 min	Hasta extracción (no más de 3 horas)
Desnivel	100 %	100 %	100 %

18. Pulse "**Ejecutar**" (Run). El volumen de reacción deberá ser **10,0 µl**. Deje que la tapa calefactada funcione a una temperatura establecida a 105 °C.
19. Pulse "**Iniciar procesado ahora**" (Start Run Now) para iniciar el proceso y compruebe que la tapa se esté calentando y el programa se haya iniciado.
20. Extraiga la placa post PCR del termociclador cuando el programa haya alcanzado 4 °C y centrifugue brevemente (a aproximadamente 1000 rpm durante 5 segundos). La placa post PCR deberá



Test Molecular RHCE BeadChip de Inmucor

extraerse del termociclador a 4 °C en las 3 horas siguientes. Las muestras centrifugadas y los controles deberán usarse de inmediato, pero pueden conservarse a una temperatura de -20 °C (o menos) durante un período de hasta 24 horas.

N.º ref. 190-10307-ES D

Página 21

Fecha de revisión: OCTUBRE de 2015

HENOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. RENOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

NE...
P...
Director...
M.N. 12.756

Página 117 de 174

G. Procesamiento post PCR: Generación de la Diana Monocatenaria**Medidas preventivas**

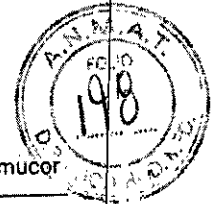
- Los pasos de la sección G deberán efectuarse de manera continua y sin interrupciones.
- Deberá extraerse la Lambda Exonucleasa del congelador para descongelarla durante la incubación del paso de Clean-up Reagent después de la PCR en la sección F. Una vez descongelada, la Lambda Exonucleasa deberá mantenerse en un criobloque (conservado a entre 2 y 8 °C) o en hielo durante la transferencia al producto de Clean-up Reagent después de la PCR.
- El producto de Clean-up después de la PCR deberá mantenerse en un criobloque (conservado a entre 2 y 8 °C) o en hielo durante estos pasos una vez descongelado (si se había congelado antes).
- Añada Lambda Exonucleasa al producto de Clean-up después de la PCR en el plazo de unos 30 minutos tras la finalización del proceso de lavado.
- Las muestras monocatenarias centrifugadas y los testigos deberán usarse inmediatamente, pero se pueden conservar a -20 °C (o menos) durante un máximo de 16 horas.

Procedimiento de análisis

1. Extraiga el Lambda Reagent (tapón violeta) del congelador 10-15 minutos antes de su uso. Descongele a temperatura ambiente.
2. Mezcle y centrifugue brevemente los productos de Clean-up a temperatura ambiente antes de su uso. Mezcle los reactivos con una mezcladora vorticial a una velocidad media durante 3-5 segundos. Centrifugue brevemente los tubos/placas a unas 1000 rpm.
3. Coloque la placa post PCR ("productos de Clean-up") en un criobloque (2-8 °C).
4. Mediante la tabla siguiente, determine el volumen adecuado, dispense el Lambda Reagent en una cinta de 8 tubos e inspeccione visualmente cada tubo. Devuelva los reactivos al almacenamiento adecuado inmediatamente después de su uso.

Tabla 6: Volúmenes de Lambda Exonucleasa

N.º muestra	8	16	24	32	40	48
Volumen de Lambda Exonucleasa (µl)	Añada 2 µl directamente a la placa post PCR	6,0	9,0	12,0	14,0	16,0



5. Dispense **2.0 µl** de Lambda Reagent en cada pocillo de la placa post PCR (puede usarse una pipeta de 8 canales). Mezcle bien tres veces mediante aspiración por pipeta.
6. Deseche la tira de 8 tubos después de añadir el Lambda Reagent a todos los pocillos de muestras.
7. Selle la placa post PCR de forma segura con precinto adhesivo para placas de termociclador.
8. Mezcle con cuidado agitando en agitadora vorticial durante unos **3-5 segundos**.
9. Centrifugue brevemente a unas 1000 rpm para que las muestras se posen en el fondo de los pocillos.
10. Cargue la placa post PCR en el termociclador y ejecute el programa **Lambda RHCE** (RHCE Lambda). Pulse "Ver" (View) para verificar que el programa sea correcto:

Ciclos	1	1	1
Temp. (°C)	37 °C	85 °C	4 °C
Tiempo	20 min	8 min	Hasta extracción (no más de 3 horas)
Desnivel	100 %	100 %	100 %

11. Pulse "Ejecutar" (Run). El volumen de reacción deberá ser **12,0 µl**. Deje que la tapa calefactada funcione a una temperatura establecida a **105 °C**.
12. Pulse "Iniciar procesado ahora" (Start Run Now) para iniciar el proceso y compruebe que la tapa se esté calentando y el programa se haya iniciado.
13. Extraiga la placa post PCR del termociclador cuando el programa haya alcanzado 4 °C y centrifugue brevemente (a aproximadamente 1000 rpm durante 5 segundos). La placa post PCR deberá extraerse del termociclador a 4 °C en las 3 horas siguientes. Las muestras centrifugadas y los controles deberán usarse de inmediato, pero pueden conservarse a una temperatura de -20 °C (o menos) durante un período de hasta 16 horas.


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. P...

IR-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
EJECUTIVO TECNICO
GUSTAVO A. P...
MIN 12 H54
Página 119 de 174

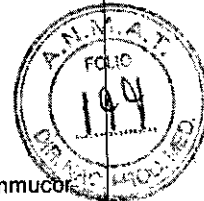
H. Elongación en la matriz BeadChip

Medidas preventivas

- Los pasos de la sección H deberán efectuarse de manera continua y sin interrupciones.
- El Elongation Reagent deberá sacarse del congelador para que se descongele durante la incubación del paso Generación de la diana monocatenaria de la sección G.
- Una vez descongelado, el Elongation Reagent deberá mantenerse en un criobloque (conservado a 2-8 °C) o en hielo.
- Evite la formación de espuma al pipetear el Elongation Reagent.
- La adición del Elongation Reagent al producto monocatenario deberá realizarse en el plazo de unos 30 minutos aproximadamente tras la extracción del producto de la diana monocatenaria del termociclador o, si está congelado, en los 30 minutos siguientes a la descongelación.
- No agite el aire comprimido.

Procedimiento de análisis

1. Prepare el incubador Boekel **al menos 30 minutos antes de usarlo**.
 - 1.1. Encienda el incubador Boekel y verifique la temperatura establecida (**55 °C**) manteniendo pulsado el botón "*".
 - 1.2. Extraiga la bandeja interior. Cubra la bandeja con dos papeles absorbentes y satúrelos con **25 ml** de agua desionizada.
 - 1.3. Vuelva a colocar la tapa en la bandeja y vuelva a insertarla en el incubador Boekel para precalentarlo.
2. Extraiga las bandejas BeadChip de la nevera **15-20 minutos** antes de su uso.
3. Extraiga el Elongation Reagent (tapón marrón) del congelador **10-15 minutos** antes de usarlo y descongélalo a temperatura ambiente. Colóquelo en un criobloque (2-8 °C) cuando esté completamente congelado.
4. Mezcle y centrifugue brevemente los productos de Lambda a temperatura ambiente antes de su uso. Mezcle los reactivos con una mezcladora vorticial durante 3-5 segundos. Centrifugue los tubos/placas a unas 1000 rpm durante cinco segundos.
5. Coloque la placa **post PCR** ("productos de Lambda") en un criobloque (2-8 °C).



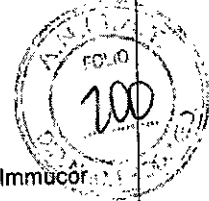
6. Mediante la tabla siguiente, determine el volumen adecuado, dispense el Elongation Reagent en una cinta de 8 tubos e inspeccione visualmente cada tubo. Devuelva los reactivos al almacenamiento adecuado inmediatamente después de su uso.

Tabla 7: Volúmenes de eMAP Elongation Mix

N.º muestra	8	16	24	32	40	48
eMAP [®] Elongation Reagent (µl)	Añada 10 µl directamente en la placa post PCR	25,0	36,0	47,0	59,0	70,0

7. Dispense **10,0 µl** de Elongation Reagent en cada pocillo de la placa post PCR (puede usarse una pipeta de 8 canales). Mezcle bien tres veces mediante aspiración por pipeta.
8. Deseche la cinta de 8 tubos después de añadir el Elongation Reagent a todos los pocillos de muestras.
9. Extraiga las bandejas BeadChip de la bolsa de aluminio y etiquételas en orden numérico.
10. Coloque con cuidado las bandejas BeadChip en el soporte para bandejas BeadChip *sin tocar la superficie de BeadChip*.
11. Registre los ID de las bandejas BeadChip para asignar las placas de muestras según corresponda.
12. Transfiera **18,0 µl** de la mezcla de Elongation Reaction en el BeadChip correspondiente con una pipeta de 8 canales. Inspeccione visualmente las puntas de pipeta durante el proceso y asegúrese de que la orientación de la bandeja sea la misma que en el mapa de placas de muestras.
13. Extraiga la bandeja precalentada del incubador Boekel. Si hay condensación dentro de la cubierta de la bandeja, séquela con un tejido que no deje pelusas.
14. Coloque con cuidado el soporte de BeadChip en la bandeja del incubador Boekel y coloque la cubierta de la bandeja completamente sobre esta.
15. Cargue la bandeja en el incubador, apriete el seguro con firmeza, cierre la puerta del incubador Boekel y establezca el tiempo en **30 minutos**. Incube las bandejas BeadChip a **55 °C durante 30 minutos**. (Tenga en cuenta: si tiene pensado realizar lecturas de la bandeja inmediatamente después de la elongación, encienda el sistema de obtención de imágenes de la matriz AIS 400 de BioArray y cargue el CD al iniciar el proceso de incubación).
16. Extraiga el soporte de BeadChip del incubador tras 30 minutos.
17. Lave la mezcla de elongación de las superficies del BeadChip con una botella de lavado con agua desionizada:
- 17.1. Sostenga la bandeja BeadChip de forma que su superficie esté vertical sobre un desagüe o recipiente de recogida.
- 17.2. Enjuague cada BeadChip de forma individual durante unos **3 segundos**. El chorro de agua deberá enfocarse en dirección perpendicular a la superficie del BeadChip, a una distancia aproximada de una pulgada.
18. Elimine el exceso de agua de las superficies del BeadChip con aire comprimido/encapsulado.
¡Precaución! No agite el aire comprimido.

19. Elimine el agua restante de la parte trasera de las bandejas con un tejido que no deje pelusas.
20. Si no puede realizar lecturas de las bandejas BeadChip lavadas y secadas inmediatamente después de la incubación, puede guardarlas protegidas de la luz durante hasta 24 horas, a temperatura ambiente, antes de realizar la lectura con el sistema 400 de BioArray.



I. Adquisición de imágenes de BeadChip

Medidas preventivas

- Encienda la fuente de luz AIS 400 de BioArray y el ordenador al menos 30 minutos antes de su uso.
- Cargue el CD "Datos de RHCE BeadChip" (RHCE BeadChip Data) una vez por lote.

Procedimiento de análisis

1. Abra e inicie el programa AISR en el escritorio.
2. Ejecute el procedimiento del test de exposición de la bandeja (ETC, Exposure Test Carrier) (consulte el manual del usuario de AIS 190-00185). Si los resultados no son los indicados en las especificaciones, póngase en contacto con BioArray para ajustar el tiempo de exposición antes de continuar.
3. Extraiga el CD de datos de RHCE de la caja de bandejas BeadChip y cargue los archivos del CD en el ordenador para cada lote nuevo.
4. Lea las bandejas RHCE BeadChip con el sistema de obtención de imágenes de la matriz AIS 400 de BioArray. Procese los datos de BeadChip con el programa informático de análisis de RHCE de BASIS.
5. Apague correctamente el AISR y la fuente de luz después de su uso.
6. Pase a BASIS para realizar la asociación de muestras y generar informes de BeadChip.

VIII. RESULTADOS ESPERADOS

A. Control de calidad

Validez del procesado: para determinar si el procesado es válido, deberán incluirse controles positivos y negativos en cada procesado. Se recomienda un control positivo con genotipo o fenotipo conocido, que deberá suministrar el laboratorio.

La interpretación de la validez de los controles positivos y negativos se hace de la manera siguiente:

Tabla 8: Criterios de validez del procesado

Control.	Resultado	Interpretación
Muestra de control positivo (PCS) Muestra de fenotipo conocido (suministrada por el laboratorio)	Fenotipo previsto	El procesado es válido si el control negativo también es válido.
	Fenotipo no previsto	El procesado no es válido y todos los tests deben repetirse.
	Mensaje de advertencia sobre HB, CV o AP	
	Resultado de IC	
Testigo negativo (NC)	≥ 18 resultados de LS en el informe de fenotipo	El procesado es válido si la PCS también es válida.
	< 18 resultados de LS en el informe de fenotipo	El procesado no es válido y el test debe repetirse.
	Mensaje de advertencia de HB o CV	

Notas:

- Si un control positivo seleccionado proporciona de forma continua un resultado de IC, sustituya el control positivo.
- Si el número de SNP que muestran llamadas LS en el control negativo es el que se ha especificado anteriormente, el aspecto de las llamadas no LS en los SNP restantes no indica contaminación (según lo determinado en estudios internos llevados a cabo en BioArray durante el desarrollo del análisis).
- Si el frasco de control negativo se contamina, póngase en contacto con BioArray.
- Las sondas aparecerán en las tablas de resultados mostradas en BASIS que podrían no utilizarse en el análisis. La validez del procesado y de la muestra solo deberá basarse en los datos que aparecen en la columna "MenAdv" (WarnMsg) de la página de la tabla "Asignación de tipificaciones wRHCE" (wRHCE Typing Assignment) en BASIS.

Validez de la muestra: para determinar si el resultado de la muestra es válido, la interpretación es como sigue.

Tabla 9: Criterios de validez de la muestra



Mensaje de advertencia	Resultado	Interpretación
HB	Los principales antígenos y variantes se proporcionan como "NTD". El genotipo se proporciona como "NTD" para todas las mutaciones.	La muestra debe repetirse.
CV		
AP		

Si no aparece ninguno de los mensajes de error anteriores, los resultados del test son válidos.

B. Análisis de los resultados

El kit RHCE BeadChip es un test cualitativo. BioArray Solutions Information System (BASIS™) calcula los datos de intensidad de señal de la matriz de BeadChip para cada oligonucleótido que detecta marcadores específicos con el fin de determinar la presencia o ausencia de los principales alelos o variantes asociadas.

Todos los cálculos se realizan mediante el programa informático de análisis RHCE de BioArray Solutions Information System (BASIS™).

Informe del genotipo: la lista siguiente (tabla 10) muestra los posibles resultados que pueden aparecer en el informe del genotipo:

Tabla 10: Posibles resultados que aparecerán en el informe del genotipo

Resultado	Significado
AA	Homozigótica para A
AB	Heterozigótica
BB	Homozigótica para B
Ax	Llamada indeterminada en B
xB	Llamada indeterminada en A
xx	Llamada indeterminada en A y B
LS	Señal baja en A y B

Nota: Para 109Ins, 'AB' no indica heterocigosidad. La sonda 'A' es un control positivo y se espera que dé positivo en presencia o ausencia de la inserción de 109bp.

Asignación de tipificaciones wRHCE: la página de asignación de tipificaciones wRHCE indica las asignaciones de C, c, E, e, así como las asignaciones de variantes fenotípicas enumeradas por chip y muestra. En la tabla Resumen de asignaciones, la presencia de un antígeno específico se muestra con un "+". La ausencia de un antígeno específico se muestra con un "0". La lista siguiente (tabla 11) muestra los resultados posibles que aparecerán en la columna de variantes fenotípicas de la tabla de asignación de tipificaciones.

Tabla 11: Los resultados posibles aparecerán en la columna de variantes fenotípicas.

Resultado	Significado
Variante X/variante X	Homocigótico para la variante X.
WT/variante X	Heterocigótico para WT y variante X.
Variante X/variante Y	Heterocigótico para las variantes X e Y.
[BLANCO]	No se ha detectado ninguna variante.
IC	Llamada indeterminada (consulte las notas a continuación).

HEMOMEDICA S.E.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
PAUL J. BOCCHINI
Directora Técnica
M.N. 12.855
Página 125 de 174

NTD	No se ha determinado ninguna tipificación.
-----	--

Notas sobre la tabla Resumen de asignaciones

- a) Se mostrarán los principales antígenos correspondientes a todas las muestras incluso si no se detecta ninguna variante en una muestra.
- b) En caso de un resultado de IC, seleccione el botón "**Mostrar detalles**" (Show Details) para visualizar las asignaciones de variantes y las puntuaciones de confianza correspondientes (según lo obtenido por el algoritmo de análisis bayesiano) para cada chip/muestra seleccionados.
 - (i) Un usuario con nivel de administrador puede seleccionar de forma manual una de las variantes proporcionadas en función de cualquier información adicional (*por ejemplo*, grupo étnico) que esté disponible para esa muestra. La variante seleccionada de forma manual se mostrará posteriormente en BASIS y en los informes en PDF como la asignación de la variante para la muestra. Una vez realizada una asignación manual, el programa informático no permitirá ninguna otra modificación, ni siquiera deshacer la asignación manual.
- c) Las variantes pueden mostrarse en la nomenclatura convencional o ISBT.
- d) En el caso de que no se detecte ninguna variante, la columna de variantes fenotípicas estará vacía y la vista "Mostrar detalles" (Show Details) mostrará WTWT en la nomenclatura convencional (principales combinaciones de antígenos en nomenclatura ISBT).

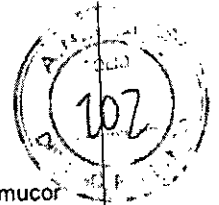
Mensajes de advertencia: en la página de análisis de datos de wRHCE, la tabla de genotipo puede mostrar llamadas de genotipo indeterminado, como Ax, xB, xx o LS para uno o más marcadores. La columna "MenAdv" (WarnMsg) muestra el recuento total de llamadas de genotipo indeterminado para una muestra junto con los mensajes de advertencia de intensidad, como HB y CV. En el caso de muestras no válidas, las llamadas de genotipo se mostrarán como 'NTD'.

En la página "Asignación de tipificaciones wRHCE" (wRHCE Typing Assignment), la columna "MenAdv" (WarnMsg) de la tabla "Resumen asignaciones" (Assignment Summary) puede mostrar HB, CV o mensajes de advertencia AP para una muestra. Los mensajes de advertencia de IC o NTD pueden visualizarse en uno o más de los principales antígenos (C, c, E o e) o en la columna de variantes fenotípicas.


Los mensajes de advertencia se muestran en la tabla siguiente (tabla 12):

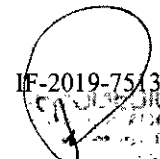
Tabla 12: En los informes de variantes de genotipo o fenotipo pueden aparecer mensajes de advertencia

Advertencia	Significado	Explicación	Ubicación de informe wRHCE
Ax	Llamada de genotipo indeterminado [Indeterminate genotype call]	Indica que las intensidades de la señal de un marcador hicieron que la muestra cayera en una "zona gris", por lo que el genotipo está parcialmente resuelto.	Informe del genotipo de wRHCE BeadChip
xB	Llamada de genotipo indeterminado [Indeterminate genotype call]	Indica que las intensidades de la señal de un marcador hicieron que la muestra cayera en una "zona gris", por lo que el genotipo está parcialmente resuelto.	Informe del genotipo de wRHCE BeadChip
xx	Llamada de genotipo	Indica que el ruido o la incertidumbre para un marcador determinado están sobre un umbral	Informe del genotipo de wRHCE BeadChip

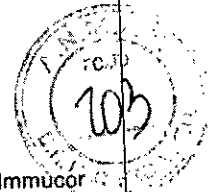


Advertencia	Significado	Explicación	Ubicación de informe wRHCE
	indeterminado [Indeterminate genotype call]	preestablecido, específico del lote, para proporcionar un genotipo de alta confianza.	
LS	Señal baja [Low Signal]	Indica que la intensidad de la señal de ambas sondas de un marcador determinado es inferior a un valor de corte de intensidad preestablecido y específico del lote, debido al diseño o a razones como una concentración baja. Es posible que aparezcan mensajes de advertencia de LS por diseño para el testigo negativo y ciertos alelos, como CeRN.	Informe de asignación de wRHCE BeadChip: -Columnas c/C/e/E Informe del genotipo de wRHCE BeadChip
IC	Llamada indeterminada [Indeterminate Call]	En las columnas de los antígenos principales, la tipificación de IC para un antígeno indica que no se ha podido determinar la tipificación en dicho antígeno. En la columna de variantes fenotípicas, la tipificación de IC indica una ambigüedad entre dos o más asignaciones de variantes fenotípicas posibles con puntuaciones de confianza comparables. Las posibles acciones de mitigación de este error son las siguientes: <ul style="list-style-type: none">• El botón "Mostrar detalles" (Show Details) proporciona a los usuarios la opción para seleccionar manualmente la variante más probable basada en su población de test.• En los casos en los que una llamada IC está acompañada de uno o más genotipos LS/xx/Ax/xB, siga los pasos para repetir el análisis, tal y como se explica en la sección "NTD" de esta tabla.	Informe de asignación de wRHCE BeadChip -Columnas c/C/e/E -Columna de variantes fenotípicas
AP	Patrón anómalo [Anomalous Pattern]	Indica que el patrón medido del marcador es diferente de los patrones que el programa informático wRHD de BioArray puede detectar en más de un número preestablecido de posiciones de marcadores. Los marcadores que muestran los genotipos LS/xx/Ax/xB contribuyen a una llamada AP. La variante fenotípica se muestra como "NTD". <ul style="list-style-type: none">• Si una llamada AP está acompañada de varias llamadas LS/xx/Ax/xB, lo más probable es que el error esté relacionado con el rendimiento y deberá repetirse tal y como se explica en la sección "NTD" de esta tabla.• En caso contrario, la muestra analizada podría contener un alelo no detectable por el kit BeadChip.	Informe de asignación de wRHCE BeadChip: -Columna "MenAdv" (WarnMsg)


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSCO


IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
Página 127 de 174

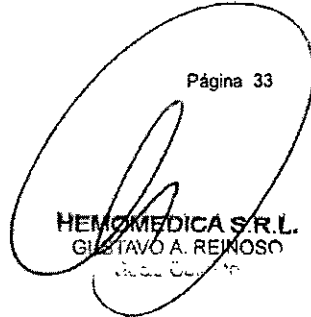
Advertencia	Significado	Explicación	Ubicación de informe wRHCE
HB	Fondo elevado [High Background]	Indica que la intensidad de fondo es superior a una intensidad de corte preestablecida y específica del lote para el BeadChip individual. Los principales antígenos, la variante fenotípica y los genotipos se muestran como "NTD". Consulte la sección "NTD" de esta tabla para mitigación.	Informe de genotipo/asignación de wRHCE BeadChip: -Columna "MenAdv" (WarnMsg)
CV	Coeficiente de variación [Coefficient of Variation]	Indica que, para una muestra determinada, el porcentaje de marcadores para los que se detectan una o ambas sondas con CV > 30 % es superior a un límite preestablecido de puntos porcentuales. Los principales antígenos, las llamadas de variante fenotípica y los genotipos se muestran como "NTD". Consulte la sección "NTD" de esta tabla para mitigación.	Informe de genotipo/asignación de wRHCE BeadChip: -Columna "MenAdv" (WarnMsg)
NTD	No se ha determinado ninguna tipificación. [No Typing determined]	Indica que no se ha determinado la tipificación debido a i) un error de HB o CV, como se ha explicado anteriormente, ii) un mensaje de advertencia AP, como se ha explicado anteriormente, iii) el genotipo LS en las mutaciones asociadas a los principales antígenos (solo en las columnas c/C/e/E), iv) mensajes de IC o NTD en cualquiera de los antígenos principales (c, C, e o E) (solo en la columna de variantes fenotípicas), v) más de cuatro recuentos de LS para marcadores que determinan la variante (solo en la columna de variantes fenotípicas). Las posibles acciones de mitigación de este error son las siguientes: • Asegúrese de que la concentración de ADN sea de 10 a 80 ng/μl, especialmente si se detectan intensidades bajas, como en iii) y en iv), anteriormente. • Repita el test desde el paso Procesamiento después de la PCR: tratamiento con amplicones (XIII) del procesamiento del test con el producto de la PCR conservado a -20 °C. Preste una atención especial a la manipulación de los reactivos, las técnicas de pipeteo y la posible contaminación. • Si persiste el mensaje de advertencia, repita el test a partir de la amplificación de la PCR (XII), con el ADN preparado conservado a -20 °C. Asegúrese de que la concentración de ADN se encuentre entre 10 y 80 ng/μl.	Informe de asignación de wRHCE BeadChip: -Columnas c/C/e/E -Columna de variantes fenotípicas Informe del genotipo de wRHCE BeadChip



Advertencia	Significado	Explicación	Ubicación de informe wRHCE
		<ul style="list-style-type: none"> Si el mensaje de advertencia continúa, llame al servicio técnico o al representante de Immucor. 	

IX. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- En el caso de una muestra determinada, las mutaciones concretas imprevistas en la sonda o en la región de unión del cebador pueden repercutir en la exactitud del resultado correspondiente a dicha muestra.
- La frecuencia relativa de los alelos se basa en un modelo que refleja la población de Estados Unidos y tal vez no se aplique a grupos de subpoblaciones específicas. En consecuencia, los usuarios deberán tener en cuenta la subpoblación específica a partir de la que se obtuvo la muestra al analizar el patrón genético presentado por el programa informático para dicha muestra.
- El programa informático RHCE de BASIS no está diseñado para convertir todas las combinaciones de genotipos a asignaciones de alelos. Sólo las combinaciones de alelos que son parte de la tabla 2 se muestran en los resultados de variantes. Por lo tanto, en algunos casos, algunas mutaciones, aunque observadas en la tabla de genotipos, podrían no estar incluidas en el análisis de variantes si la mutación se produce en un patrón que no representa a ninguno de los alelos de la tabla 2. Los patrones no representados por los alelos de la tabla 2 pueden tipificarse como el alelo más cercano o asignarse a "NTD".
- El análisis RHCE no puede detectar híbridos RHCE-RHD (excepto para CeRN, como se indica a continuación).
- El alelo CeRN solo puede detectarse en el estado homocigótico.
- En el caso de los alelos que contienen la mutación 733G, en ocasiones se ha observado una señal baja (LS) en el exón 6. La identificación de alelos realizada por el sistema de análisis RHCE no se ve afectada por la pérdida de información del exón 6 en estos casos.
- Algunos alelos no se pueden detectar con un análisis RHCE debido a la ausencia de marcadores relevantes en el panel RHCE BeadChip (consulte la tabla 13). Estos alelos pueden tipificarse de forma incorrecta, ya que están incluidos en el análisis RHCE.
- Pueden generarse falsos positivos o resultados no válidos en los casos infrecuentes en los que una muestra presente una circunstancia a nivel molecular (como variaciones en la secuencia de ADN incluyendo un codón de detención prematuro, una mutación de cambio de estructura, una mutación de los sitios empalme, genes híbridos o genes modificadores) que conlleve un fenotipo nulo del RhCE, y los cambios en los nucleótidos asociados a estos acontecimientos no están controlados de forma explícita por el análisis.


HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO

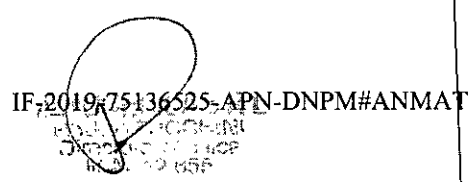

 IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

Tabla 13: Alelos no detectados por el kit de tests RHCE BeadChip

Nombre de alelo	Detalle de alelo
RHCE*01.06 RHCE*ce.06	RHCE*ce254C
RHCE*01.13 RHCE*ce.13	RHCE*ce(delAGA)
RHCE*01.14 RHCE*ce.14	RHCE*ce662G
RHCE*01.15 RHCE*ce.15	RHCE*ce286A
RHCE*01.21 RHCE*ce.21	RHCE*ce341A
RHCE*01.23	RHCE*ce649C
RHCE*01.24	RHCE*ce512A
RHCE*01.25	RHCE*ce730A
RHCE*01.26	RHCE*ce872T
RHCE*01.27	RHCE*ce1154C
RHCE*01.28	RHCE*ce1254C
RHCE*01.29 RHCE*ceBOL	RHCE*ce-D(4-9)-ce
RHCE*01N.01 RHCE*ceN.01	RHCE*ce(del80-84)
RHCE*01N.02 RHCE*ceN.02	RHCE*ce(delG 960-62)
RHCE*02.08.02 RHCE*Ce.08.02 RHCE*CeNR	RHCE* Ce-D(6-10)
RHCE*02.10.02 RHCE*Ce.10.02 RHCE*CeRN.02	RHCE*Ce-D(4)-ce + 455A
RHCE*02.11 RHCE*Ce.11	RHCE*Ce286A
RHCE*02.13 RHCE*Ce.13	RHCE*Ce364C
RHCE*02.14 RHCE*Ce.14	RHCE*Ce497T
RHCE*02.15 RHCE*Ce.15	RHCE*Ce689C
RHCE*02.16 RHCE*Ce.16	RHCE*Ce728G
RHCE*02.17 RHCE*Ce.17	RHCE*Ce800A
RHCE*02.18 RHCE*Ce.18	RHCE*Ce890C
RHCE*02.19 RHCE*Ce.19	RHCE*C2464G,1118T
RHCE*02.20 RHCE*Ce.29	RHCE*Ce(del79-81CTC)
RHCE*02N.01 RHCE*CeN.01	RHCE*Ce(del966-69)
RHCE*03.02 RHCE*cE.02	RHCE*D(1-3)-CE
RHCE*03.06	RHCE*cE28T
RHCE*03.08 RHCE*cE.08	RHCE*cE356A
RHCE*03.09 RHCE*cE.09	RHCE*cE374A
RHCE*03.10 RHCE*cE.10	RHCE*cE506A
RHCE*03.11 RHCE*cE.11	RHCE*cE908A
RHCE*03.12 RHCE*cE.12	RHCE*cE464G,477G
RHCE*03N.01 RHCE*cEN.01	RHCE*cEdel350-358
RHCE*03N.02 RHCE*cEN.02	RHCE*cE906deIC
RHCE*04.01 RHCE*CE.01	RHCE*CE722T
RHCE*04N.01 RHCE*cEN.01	

**X. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO**

El kit RHCE BeadChip se ha evaluado en cuatro centros independientes de análisis clínicos de Europa y Estados Unidos. Se analizaron un total de 419 muestras con el kit RHCE BeadChip y otros métodos de referencia, incluidos la serología u otros tests moleculares (RFLP y secuenciación). Es importante tener en cuenta que las muestras se seleccionaron específicamente para alcanzar una cobertura máxima de las variantes objetivo del análisis RHCE BeadChip. Los resultados de la evaluación del rendimiento se presentan a continuación:

Tabla 14: Características del rendimiento general del kit RHCE BeadChip

Método de referencia	Porcentaje de concordancia*
Secuenciación	99 % (248/251)
Serología	100 % (105/105)**
RFLP	100 % (42/42)

- * El cálculo de porcentaje de concordancia solo incluyó resultados válidos detectados por el kit BeadChip, como afirma el test.
- ** Había tipificaciones serológicas concluyentes y no concluyentes disponibles para 160 tipificaciones de antígenos principales (c, C, e, E) en 48 muestras. Las tipificaciones de 105 antígenos se demostraron de forma concluyente mediante la serología y coincidieron con los resultados de BeadChip (concordancia del 100 %). Las 55 tipificaciones restantes de antígenos principales fueron no concluyentes con métodos de serología. Variantes identificadas de RHCE BeadChip asociadas a los antígenos principales para el 72,7 % (40/55) de los resultados de serología no concluyentes.

Tabla 15: Lista de variantes detectadas en el estudio de la evaluación del rendimiento de RHCE

Variantes	N.º de muestras
WT	217
ce(48C)	37
ceTI	3
ce(1025T)	5
ceAR	27
ceEK	15
ceMO	20
ceBI o ceSM	6
ceSL	0
ceRT	0
ceRA	3
ce(733G)	47
ce(48C,733G)	17
ce(48C,733G,1006T)	23
ce(48C,733G,1025T)	0
ce(733G,1006T)	2
ceCF	8

Variantes	N.º de muestras
ce(697G,733G)	1
ceJAL	4
ce(48C,340T,733G)	0
ce(48C,733G,748A)	0
ce(733G,748A)	0
ceHAR	1
CeMA	7
CeFV	2
Ce(365T)	0
CeVA	0
CeCW	7
ce(48C,122G)	0
CeCX	2
ce(48C,106A)	0
CeRN	2
Ce(344G)	0
cEEW	3
cEFM	0
cE(602C)	16
cEKH	0
cE(344C)	0
(48C,712G,733G)	0
(340T,344G)	0
ce(48C,697G,733G,1006T)	2
ce(48C,697G,712G,733G,1006T)	0
ce(48C,733G,744C)	6
Ce(667T)	3
cE(365T)	2

A. Reproducibilidad

Para los estudios de precisión, se suministraron muestras con codificación ciega (n = 6) a 4 centros independientes de análisis clínicos. En cada centro, el mismo usuario examinó 3 veces las muestras, en 3 días distintos (variabilidad intraanálisis). Todos los centros obtuvieron resultados con una concordancia del 100 % con las tipificaciones de referencia, todos los días. El estudio de reproducibilidad multilote realizado de forma interna en un panel ciego de 15 muestras también demostró una concordancia del 100 % con las tipificaciones de referencia.



B. Tests para las sustancias de interferencia

Se observó que las siguientes sustancias no interfieren con el kit RHCE BeadChip.

Microorganismos. Se examinaron los microorganismos siguientes a 10^6 UFC por ml de sangre:

Bacillus subtilis, Corynebacterium diphtheria y jeikeium, Escherichia coli, Propionibacterium acnes, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Staphylococcus epidermidis, haemolyticus y aureus, Streptococcus pneumonia y mitis, Aspergillus niger, Candida albicans. Se analizaron también concentraciones citopáticas del virus de la gripe y no se observó ninguna interferencia.

Sustancias exógenas. Amoxicilina ($2,06E + 02 \mu\text{mol/l}$), sal potásica de penicilina G ($2,73 \mu\text{g/ml}$), hidroxurea ($3,50 \mu\text{g/ml}$), paracetamol ($1,32E \mu\text{mol/l}$), ibuprofeno ($2,43 \mu\text{mol/l}$), ácido acetilsalicílico ($3,62E \mu\text{mol/l}$), naproxeno ($2,17E \mu\text{mol/l}$), clopidogrel (Plavix) ($3,00E \mu\text{mol/l}$), warfarina ($3,25E \mu\text{mol/l}$), loratadina ($7,80E \mu\text{mol/l}$), atorvastatina (Lipitor) ($5,48E + 2 \mu\text{mol/l}$), fenilefrina HCl ($4,91E \mu\text{mol/l}$), nadolol ($3,88E \mu\text{mol/l}$), ácido fólico (vit. B) ($1,50E + 1 \mu\text{mol/l}$), ácido ascórbico (vit. C) ($3,42E \mu\text{mol/l}$)

Sustancias endógenas. Valores patológicos de hemoglobina (hasta 500 g/l), bilirubina (hasta 67 mg/dl), triglicéridos (hasta 1000 mg/dl) y proteínas totales (hasta 90 g/l)

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Subgerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
J. J. CICHINI
Gerente Técnico
12 855

XI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed. Oxford, Blackwell Science, 1997.
- [2] Reid ME. "Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification." *Transfusion* 2003;43:1748-57.
- [3] Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajhala P, Hue-Roye K. "A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing." *Transfusion* 2005; 45:680-688.
- [4] Reid ME, Lomas-Francis C. The Blood Group Antigen FactsBook. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2003.
- [5] ISBT - Terminology for Blood Type Alleles: Page updated 22-Oct-2010: <http://ibgri.blood.co.uk/ISBTPages/AlleleTerminology/004%20RHCE%20final%20alleles%20Oct%2010%20Jill.pdf>.
- [6] Daniels GL, Faas BHW, Green CA et. al. The VS and V blood group polymorphism in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion* 1998;38:951-958.
- [7] Faas BHW, Beckers EAM, Wildoer P, et. al. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion* 1997; 37:38-44.
- [8] Pham B, Peyard T, Juszczak G, Dubeaux I, et. al. Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hrB-, HrB- phenotype in black persons. *Transfusion* 2009; 49:495-504.
- [9] Westhoff CM, Vege S, Nance S, Frame T, Moulds MK. Determination of the molecular background of the Crawford antigen occurring with a weak C antigen (abstract). *Vox Sang* 2004;87(Suppl 3):S17-S92.
- [10] Döscher, A., Vogt, C., Bittner, R., Gerdes, J., Petershofen, E. K. and Wagner, F. F. (2009), *RHCE* alleles detected after weak and/or discrepant results in automated Rh blood grouping of blood donors in Northern Germany. *Transfusion*, 49: 1803-1811.
- [11] Flegel, W. A., Wagner, F. F., Chen, Q., Schlänsker, G., Frame, T., Westhoff, C. M. and Moulds, M. K. (2006), The *RHCE* allele *ceCF*: the molecular basis of Crawford (RH43). *Transfusion*, 46: 1334-1342.
- [12] Vege S, Crowley S, Horn T, and Westhoff CM, Diversity of RHCE and Identification of twelve new alleles. *Transfusion*, 50: 49A-50A.
- [13] Pham BN, Peyrard T, Juszczak G, Beolet M, Deram G, Martin-Blanc S et.al (2010) Analysis of RhCE variants among 806 individuals in France: considerations for transfusion safety, with emphasis on patients with sickle cell disease. *Transfusion*, 51(6): 1249-60.
- [14] García ME, Blanco JL, Caballero J, Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr;40(4):1567-8.



Patentes

Todos los bienes y servicios se venden sujetos a las cláusulas de ventas de BioArray Solutions Ltd. y están cubiertos por uno o más de los siguientes: números de patente 6,797,524; 7,427,512; 7,335,153; 7,390,676; EP1311839B1 (pendiente de patentes adicionales).

La compra de este producto otorga al comprador derechos bajo determinadas patentes de Roche, para utilizarlas únicamente con el fin de proporcionar servicios de diagnóstico *in-vitro* para personas. La compra no concede ninguna patente general ni otra licencia de ningún tipo distintas de este derecho de uso concreto.

Este producto y su empleo están cubiertos por una o más de las patentes siguientes: EP 0 820 524, US 6,150,095, 6,307,039, 6,770,751 y 7,192,707, Jap 2006 246897 y patentes pendientes. El comprador solo recibe una licencia para practicar los métodos y procesos cubiertos por estas patentes cuando utilice este producto en solo en aplicaciones de inmunohematología molecular.

La ADN polimerasa Thermo Sequenase® de este producto está cubierta por la patente de Estados Unidos 5,614,365 y equivalentes extranjeras propiedad de la Universidad de Harvard y con licencia exclusiva para GE Healthcare, y por la patente de Estados Unidos 5,885,813 y equivalentes extranjeras propiedad de GE Healthcare. Solo para uso en investigación (no se incluye la investigación *in-vivo*) o para uso diagnóstico comercial *in-vitro*. No debe utilizarse en aplicaciones terapéuticas o *in-vivo*. Otros usos exigen licencias que pueden adquirirse de GE Healthcare Bio-Sciences Corp.

Marcas comerciales

BeadChip, AIS, BASIS e eMAP son marcas comerciales de BioArray Solutions Ltd.

HotStarTaq DNA Polymerase®, QIAcube, QIAamp y QIAGEN son marcas registradas de QIAGEN GmbH, Hilden (Alemania).

Veriti y GeneAmp son marcas registradas de Life Technologies Corporation.

DNA AWAY es una marca comercial de Molecular BioProducts, Inc.

InSlide Out es una marca registrada de Boekel Scientific

MiniMouse II es una marca comercial de Denville Scientific Inc.

MicroAmp es una marca registrada de Applied Biosystems

Excel es una marca registrada de Microsoft Corporation

Thermo Sequenase es una marca registrada de GE Healthcare UK Limited

Los nombres registrados, las marcas, etc. utilizados en este documento, aunque no aparezcan específicamente con la marca correspondiente, no se consideran desprotegidos por la ley.

Fabricante:

BioArray Solutions, Ltd.
35 Technology Drive, Suite 100
Warren, NJ 07059
EE. UU.

Teléfono (+1) 908 226-8200
Fax (+1) 908 226-0800

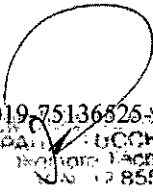
BASCustomerServiceNJ@immucor.com
<http://www.immucor.com>

N.º ref. 190-10307-ES D

Página 39

Fecha de revisión: OCTUBRE de 2015


HEIMMIDICA S.R.L.
GUSTO


IF-2019-75136525-ARV-DNPM#ANMAT
PAVI UCCHINI
Ingeniero Técnica
N.º 12855

Página 135 de 174



RHD de Immucor: Ensayo Molecular BeadChip

IMMUCOR.

RHD de Immucor

ENSAYO MOLECULAR BEADCHIP



BioArray Solutions Ltd.
35 Technology Drive, Suite 100
Warren, NJ 07059 EE. UU.



Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Adam-Opel-Strasse 26 A
63322 Rödermark, ALEMANIA



N.º ref. 190-10302-ES Rev. D

Fecha de revisión: 12-2015

Página 1

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
Pablo Zúñiga
Director General
Página 136 de 174

Índice

I.	INTRODUCCIÓN	3
A.	Usado previsto.....	3
B.	Resumen del ensayo	3
C.	Descripción del producto	4
II.	CONTENIDO DEL KIT BEADCHIP, EQUIPO Y SUMINISTROS NECESARIOS	7
A.	Contenido del kit RHD (800-10220-48).....	7
B.	Equipo necesario	7
C.	Equipo recomendado.....	8
D.	Suministros necesarios.....	10
III.	DEFINICIÓN DE SÍMBOLOS	11
IV.	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	11
V.	TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD	14
VI.	RECOGIDA DE MUESTRAS	14
VII.	PROCEDIMIENTO	15
A.	Programación del termociclador.....	15
B.	Notas acerca del procedimiento.....	15
C.	Preparación de la mezcla maestra para la PCR.....	16
D.	Amplificación de la PCR	17
E.	Procesamiento después de la PCR: tratamiento con amplicones	19
F.	Procesamiento post-PCR: generación de la diana monocatenaria.....	20
G.	Elongación de la matriz en BeadChip	22
H.	Adquisición de imágenes de BeadChip.....	24
VIII.	RESULTADOS ESPERADOS	25
A.	Evaluación: Control de calidad.....	25
B.	Análisis de los resultados	26
IX.	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	30
X.	CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO	34
XI.	BIBLIOGRAFÍA	38



Kit RHD BeadChip

I. INTRODUCCIÓN

A. Uso previsto

El kit RHD BeadChip es un ensayo cualitativo de diagnóstico in vitro indicado para la determinación molecular de diversas variantes del gen RHD significativas desde el punto de vista clínico que son responsables de la expresión normal y alterada o ausente del antígeno eritrocitario humano RhD mediante el análisis genómico de ADN. Consiste en un ensayo para determinar las variantes de los antígenos tras los procedimientos habituales empleados para determinar el estado del antígeno Rh.

B. Resumen del ensayo

El kit RHD BeadChip de BioArray Solutions emplea la tecnología patentada de análisis multiplexado mediante elongación de polimorfismos (eMAP[®]) para identificar la presencia o ausencia de los alelos seleccionados asociados a un fenotipo dado.

Se extrae el ADN genómico de la sangre completa y se somete a una PCR multiplexada que amplifica los fragmentos de interés del gen RHD. Después de la amplificación, a los amplicones se les aplica Clean-up Reagent y Lambda Exonuclease para extraer el exceso de cebadores y dNTP y hacer que los amplicones de PCR sean monocatenarios, respectivamente. Los amplicones monocatenarios se mezclan con el reactivo eMAP y se aplican a la matriz BeadChip de BioArray Solutions que contiene sondas complementarias. Después de la hibridación de los amplicones monocatenarios con las sondas, el ADN se extiende e incorpora dCTP marcado con fluorescencia sólo en las sondas en las que el extremo 3' coincide con el ADN hibridado. Los productos de elongación de los alelos A y B se detectan de forma simultánea mediante la imagen de toda la matriz.

La matriz de BeadChip está formada por una biblioteca inmovilizada de diferentes tipos de microesferas, en la que cada tipo tiene una firma fluorescente única y transporta una sonda única, unida mediante enlaces covalentes. La biblioteca consta de todas las sondas de interés, incluidos los controles positivos internos que permiten la detección simultánea de los polimorfismos de interés.

El sistema de obtención de imágenes de la matriz BioArray Solutions Array Imaging System (AIS400C) se usa para obtener imágenes y capturar la señal fluorescente de las microesferas individuales dentro de la matriz de BeadChip, e informar sobre la intensidad media de la señal, el coeficiente de variación de las intensidades y el número de microesferas medidas por cada tipo de sonda. El programa informático de análisis de RHD en el sistema de información de BioArray Solutions (BASIS) genera los resultados del ensayo.

La frecuencia de los alelos usada para generar el informe en este ensayo se basa en un modelo que refleja la población de Estados Unidos y tal vez no se aplique a grupos específicos de subpoblaciones.

C. Descripción del producto

Los anticuerpos dirigidos contra RhD humano pueden causar reacciones adversas importantes a las transfusiones debido a la incompatibilidad del antígeno RhD, así como la alteración de su expresión [1]. La incompatibilidad del grupo sanguíneo RhD entre una mujer embarazada y el feto puede causar aloimmunización materna y consiguientemente, la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN). La incidencia del antígeno RhD negativo y alterado, representada por la expresión débil y parcial del gen, está presente en todos los grupos de población y puede causar discrepancias y una mala interpretación con el uso de reactivos serológicos aprobados [2].

Los mecanismos genéticos de la alteración de los fenotipos de RhD (D débil, D parcial y negativo D) son muy complejos y consisten en conversiones, eliminaciones ("deleciones") y mutaciones puntuales del gen, que permiten la aplicación del análisis del ADN [3, 4].

El kit de análisis RHD BeadChip utiliza 35 marcadores genéticos relacionados con los fenotipos de RhD (véase la tabla 1) para hacer llamadas de variantes (tabla 2).

Tabla 1: Marcadores genéticos en el kit RHD BeadChip

Aminoácido	Polimorfismo de nucleótidos	Aminoácido	Polimorfismo de nucleótidos
S3C	8 C>G	E233K	697 G>A
W16C	48 G>C	V238M	712 G>A
W16X	48 G>A	V245L	733 G>C
L62F	186 G>T	G263R	787 G>A
R70Q	209 G>A	Y269X	807 T>G
R114W	340 C>T	V270G	809 T>G
A137V	410 C>T	V279M	835 G > A
A149D	446 C>A	G282D	845 G > A
N152T	455 A>C	T283I	848 C>T
IVS3+1G/A	In3+1G>A	M295I	885 G>T
psi D	Duplicación de In3 -19 37 bp	I342T	1025 T>C
M170T	509 T>C	D350H	1048 G > C
I172F	514 A>T	G353W	1057 G>T
T201R	602 C>G	G355S	1063 G>A
F223V	667 T>G	G385A	1154 G>C
A226P	676 G>C	E398V	1193 A>T
S230I	689 G>T	1227G/A	1227 G>A
E233Q	697 G>C		



Tabla 2: Variantes fenotípicas detectadas por el kit RHD BeadChip

Nombres de BeadChip ^{1,2,3,4}	Nombres de ISBT [5] ^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}	Nombres de BeadChip ^{1,2,3,4}	Nombres de ISBT [5] ^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}
possible D ^a	RHD*01	DBS0	RHD*05.03
1227A (Del)	RHD*01EL.01	DV de tipo 4	RHD*05.04
Eliminación de RHD	RHD*01N.01	DV de tipo 6	RHD*05.06
RHD-CE(3-9)-D	RHD*01N.04	DV de tipo 8	RHD*05.08
RHD-CE(3-7)-D	RHD*01N.06	DV de tipo 9	RHD*05.09
RHD-CE(4-7)-D	RHD*01N.07	DVI	RHD*06
48A (W16X)	RHD*01N.08	DAR	RHD*09.01
807G (Y269X)	RHD*01N.18	DAR-E	RHD*09.02
D débil de tipo 1	RHD*01W.1	D débil de tipo 4.0 o 4.3	RHD*09.03 o RHD*09.05
D débil de tipo 1.1	RHD*01W.1.1	D débil de tipo 4.1	RHD*09.04
D débil de tipo 14, 40 o 51	RHD*01W.14, RHD*01W.40 o RHD*01W.51	DAU1	RHD*10.01
D débil de tipo 17	RHD*01W.17	DAU2	RHD*10.02
D débil de tipo 2	RHD*01W.2	DAU3	RHD*10.03
D débil de tipo 47	RHD*01W.47	DAU4 o DV de tipo 5	RHD*10.04 o RHD*05.05
D débil de tipo 29	RHD*01W.29	DAU5 o DV de tipo 1 o DBS2	RHD*10.05, RHD*05.01 o RHD*13.02
D débil de tipo 3	RHD*01W.3	D débil de tipo 11	RHD*11
D débil de tipo 34	RHD*01W.34	DOL o DOL2	RHD*12.01 o RHD*12.02
D débil de tipo 41	RHD*01W.41	DOL3	RHD*12.03
D débil de tipo 5	RHD*01W.5	DBT1	RHD*14.01
DIIIa	RHD*03.01	DBT2	RHD*14.02
DIIIb	RHD*03.02	D débil de tipo 15	RHD*15
DIIIc	RHD*03.03	DCS1 o DFV	RHD*16.01 o RHD*30
DIII de tipo 4	RHD*03.04	DCS2	RHD*16.02
DIII de tipo 6 o DIII de tipo 7	RHD*03.06 o RHD*03.07	DFR o DFR3	RHD*17.01 o RHD*17.03
DIII de tipo 7	RHD*03.07	DFR2	RHD*17.02
DIVa	RHD*04.01	DFR4	RHD*17.04
DIVa de tipo 2	RHD*04.02	DHMI	RHD*19
DIV de tipo 3	RHD*04.03	IVS3+1G>A (Del)	RHD*208
DIV de tipo 4	RHD*04.04	DNB	RHD*25
DIV de tipo 5 o DIVb	RHD*04.05 o RHD*04.06	DUC2	RHD*37
DIVb	RHD*04.06	DIIIa-CE(4-7)-D [§]	N. D. [6]
RHD psi	RHD*04N.01	RHCE(1-3)-D(4-10)	N. D. [7]
DV de tipo 2 o DBS1	RHD*05.02 o RHD*13.01	ceHAR	RHCE*01.22
DV de tipo 2, DBS1 o DV de tipo 7	RHD*05.02, RHD*13.01 o RHD*05.07	Delección de RHD (posible rG)	RHD*01N.01 (posible RHCE*02.03)

Si se dispone de la terminología de la Sociedad Internacional para la Transfusión de Sangre (ISBT) [5], está indicado su uso.

§ Las asignaciones de tipificación de RHD se basan en la información extraída del grupo de polimorfismos de RHD que se describen con mayor frecuencia en la bibliografía. Así pues, la asignación "possible D"/R*01 obtenida del kit de RHD deberá interpretarse como la ausencia de variantes de RHD cubiertas del grupo y no como la presencia del gen RHD no alterado. La asignación "possible D"/R*01 del kit RHD BeadChip no incluye el 2,9 % de las variantes comunicadas hasta la fecha en la base de datos de la ISBT.

§§ Detectar el gen híbrido DIIIa-CE(4-7)-D en una muestra indica la presencia de r⁶ o

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. BEINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
RAUL ZILBERMAN
Director Técnico
Página 140 de 174

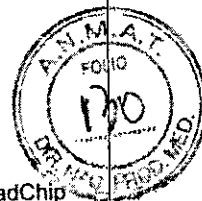
(C)ces [6]. Para la confirmación, debe analizarse la muestra con el RHCE BeadChip Kit para comprobar la presencia de ce(733G, 1006T), ce(48C, 733G, 1006T) o ce(48C, 697G, 733G, 1006T).

Además de los negativos para D que se informan mediante BASIS, en la tabla 3 se muestran los alelos híbridos que se consideran, según las referencias, también como negativos para D.

Tabla 3: Alelos híbridos negativos para D

Híbridos con fenotipos negativos para RHD.
RHCE(1-3)-D(4-10) [7]
RHD-CE(3-7)-D [10]
RHD-CE(3-9)-D [11]
RHD-CE(4-7)-D [10] [12]
DIIIa-CE(4-7)-D [13]

Las tablas anteriores no incluyen en absoluto todas las posibles variaciones genéticas de RHD. Consulte las variaciones de RHD no cubiertas por este ensayo en el apartado de limitaciones.

**II. CONTENIDO DEL KIT BEADCHIP, EQUIPO Y SUMINISTROS NECESARIOS****A. Contenido del kit RHD (800-10220-48)**

REF.	Descripción	Cantidad*
800-00221	Mezcla para PCR RHD eMAP	1 x 900 µl
800-10242	HotStarTaq DNA Polymerase	1 x 155 µl
800-00191	Clean-up Reagent	1 x 330 µl
800-00195	Lambda Exonuclease	1 x 330 µl
800-00193	eMAP Elongation Mix	1 x 600 µl
800-00287	Control negativo**	1 x 1000 µl
830-00059	Bandeja RHD eMAP 8-BeadChip	6 bandejas x 8 matrices de BeadChip
800-10276	CD de datos de la bandeja RHD	1

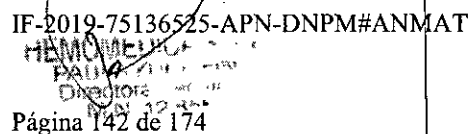
* Los reactivos líquidos se han sobrellenado para garantizar que se recupere el total de la cantidad indicada.

** Agua para PCR, testigo sin ADN

B. Equipo necesario

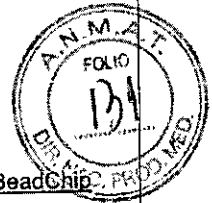
Descripción	Número de catálogo
Sistema de obtención de imágenes de la matriz AIS 400	(BioArray) 790-10007, 790-20006, 790-20016
Dispositivo de hibridación (incubación) (Boekel Inslide Out™)	(Boekel) 241000
Termociclador (Veriti de Applied Biosystems)	(Applied Biosystems) 4375786
Nevera (capacidad para mantener temperaturas de 2 a 8 °C)	-
Congelador sin formación de escarcha (con capacidad para mantener temperaturas de -20 °C o inferiores)	-


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente


IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente
Página 142 de 174

C. Equipo recomendado

Descripción	Número de catálogo*
Criobloque (se recomienda Denville o uno equivalente)	(Denville) R6670
Centrífuga de microplacas (se recomienda el modelo 5430 de Eppendorf o uno equivalente)	(Fisher) 05-400-017
Gradillas de tubos para PCR (se recomienda Fisher o unas equivalentes)	(Fisher) 05-541-50
Campana para estación de trabajo de PCR con luz UV (se recomienda CBS Scientific o una equivalente)	(CBS Scientific) P-030-02
Pipetas de precisión, multicanal, capaces de suministrar de 0,5 a 10 μ l (se recomienda Fisherbrand® o equivalentes) <ul style="list-style-type: none"> Exactitud: \pm 12 al 2,4 % Precisión: < 8 al 1,6 % 	(Fisher) 21-377-825
Pipetas de precisión, multicanal, capaces de suministrar de 5 a 50 μ l (se recomienda Fisherbrand® o equivalentes) <ul style="list-style-type: none"> Exactitud: \pm 5,0 al 1,5 % Precisión: < 2,0 al 0,7 % 	(Fisher) 21-377-827
Pipetas de precisión, monocanal, capaces de suministrar de 0,5 a 10 μ l (se recomienda Eppendorf o equivalentes) <ul style="list-style-type: none"> Exactitud: \pm 2,5 al 1 % Precisión: \leq 1,8 al 0,4 % 	(Fisher) 13-684-250
Pipetas de precisión, monocanal, capaces de suministrar de 10 a 100 μ l (se recomienda Eppendorf o equivalentes) <ul style="list-style-type: none"> Exactitud: \pm 3,0 al 0,8 % Precisión: \leq 1,0 al 0,2 % 	(Fisher) 13-684-250
Pipetas de precisión, monocanal, capaces de suministrar de 100 a 1000 μ l (se recomienda Eppendorf o equivalentes) <ul style="list-style-type: none"> Exactitud: \pm 3,0 al 0,6 % Precisión: \leq 0,6 al 0,2 % 	(Fisher) 13-684-250
QIAGEN® QiaCube®	(Qiagen) 9001292
Centrifugadora de tubos (se recomienda Denville MiniMouse II™ o una equivalente)	(Denville) C0801
Mezcladora vorticial con adaptadores para tubo y planos (se recomienda Denville o una equivalente)	(Denville) S7030



RHD de Immucor: Ensayo Molecular BeadChip

* Los números de referencia del fabricante de pipetas podrían cambiar. Consulte siempre la información descriptiva en su idioma cuando solicite suministros si no está seguro de los números de catálogo.

N.º ref. 190-10302-ES Rev. D

Página 9

Fecha de revisión: 12-2015


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

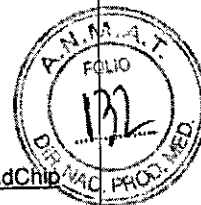

HEMOMEDICA S.R.L.
RAUL G. ...
Gerente

Página 144 de 174

D. Suministros necesarios



Descripción	Numero de catálogo*
Tubos para centrifugadora de 1,5 ml (se recomienda Eppendorf™ o equivalentes)	(Fisher) 05-402-24B
Tapones para tubos de termociclador de pared fina de 0,2 ml para tira de 8 tubos (se recomienda Applied Biosystems MicroAmp® 8-Cap Strip o equivalentes)	(Applied Biosystems) N8010535
Tubos de termociclador de pared fina de 0,2 ml para tira de 8 tubos (se recomienda Applied Biosystems MicroAmp® 8-Tube Strip de 0,2 ml o equivalentes)	(Applied Biosystems) N8010580
Placa para PCR de polipropileno sin faldón de 96 pocillos y 0,3 ml (se recomienda Fisherbrand® o equivalente)	(Fisher) 14230232
Agua para lavado BeadChip (se recomienda Invitrogen)	(Invitrogen) 10977-023
Aire comprimido o encapsulado (sin aceite) (se recomienda Fisherbrand® o equivalente)	(Fisher) 23-022523
Descontaminante (se recomienda Molecular BioProducts™ DNA AWAY™ o uno equivalente)	(Fisher) 21-236-28
Kit de extracción de ADN (se recomienda el minikit de ADN sanguíneo QIAamp® DSP de Qiagen® o uno equivalente)	(Qiagen) 61104
Puntas de pipeta con filtro desechables (resistentes a aerosoles) que cubren el intervalo de 0,1 a 1000 µl (se recomienda epTIPS™ de Eppendorf™ con filtro o equivalentes)	(Fisher) 05-403-14 (Fisher) 05-403-18 (Fisher) 05-403-20
Precintos de placas para PCR (se recomienda film adhesivo transparente MicroAmp® de Applied Biosystems® o uno equivalente)	(Applied Biosystems) 4306311
Papeles absorbentes de alta calidad multipliegue (se recomienda Uline o equivalentes)	(Uline) S-7127

* Los números de referencia del fabricante podrían cambiar. Consulte siempre la información descriptiva en su idioma cuando solicite suministros si no está seguro de los números de catálogo.



III. DEFINICIÓN DE SÍMBOLOS

Se pueden encontrar los siguientes símbolos especiales en los componentes del kit RHD BeadChip:

Símbolo	Definición
	Contenido.
	CD que contiene los archivos de datos y las instrucciones de uso.

IV. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

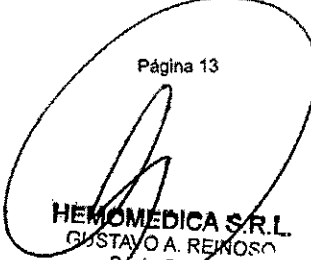
1. Todas las muestras sanguíneas deben considerarse potencialmente infecciosas y manejarse aplicando precauciones universales. Use un equipo protector personal adecuado durante todo el análisis, incluidos guantes, protección ocular y bata de laboratorio. En caso de que se produzca contacto con los ojos, lávelos de forma inmediata con abundante agua y busque ayuda médica. Para más información acerca de la seguridad, consulte el sitio web:
<http://extranet.immucor.com/>
2. Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de reactivos o muestras con la piel y membranas mucosas.
3. Deseche los materiales usados de acuerdo con las normativas del centro o locales para la eliminación de materiales potencialmente biopeligrosos. Los derrames de material potencialmente infeccioso se deben limpiar y eliminar inmediatamente de acuerdo con las normas del centro y los procedimientos para la manipulación y eliminación de materiales potencialmente biopeligrosos.
4. La tecnología de PCR es sensible a la contaminación, especialmente de su propio producto. Los aerosoles de amplicones para PCR que se generan durante los pasos para después de la PCR son una fuente frecuente de contaminación. Por lo tanto, se debe tener cuidado de evitar las salpicaduras excesivas y la generación de aerosoles. Durante el uso del kit, deben seguirse las buenas prácticas generales de laboratorio para los laboratorios moleculares, lo que incluye limpiar las superficies de trabajo antes del procesamiento o preparación de las muestras para PCR con lejía al 10 % recién preparada (o equivalente), usar luz ultravioleta (UV) en campanas o armarios de seguridad biológica entre usos, separar en espacio y tiempo las actividades antes y

después de la PCR, usar reactivos para PCR en partes iguales, usar testigos positivos y negativos, etc. El uso de una técnica constante y meticulosa, además de la incorporación libre y la monitorización de los controles, asegurarán un método seguro y proactivo para controlar y prevenir la contaminación de la PCR.


5. Los laboratorios deben validar sus propios procedimientos de limpieza.
6. La contaminación de los reactivos o las muestras puede provocar resultados erróneos. Por lo tanto, tenga cuidado de evitar la contaminación de este producto durante su uso. No utilice reactivos si sospecha que puedan estar contaminados.
7. La contaminación del ADN por inhibidores de la PCR, como el etanol, puede interferir con la reacción de PCR.
8. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede provocar resultados incorrectos.
9. El incumplimiento de las directrices de uso recomendadas puede provocar un rendimiento no óptimo del producto. En función de la naturaleza y gravedad del incumplimiento, puede producirse un fallo del análisis (muestra individual o fallos de la ejecución) o unos resultados erróneos.
10. Use los reactivos del kit y las bandejas BeadChip, tal como se suministran. Su dilución o alteración puede generar resultados erróneos.
11. No mezcle reactivos ni bandejas BeadChip de lotes diferentes.
12. No use frascos con fugas o no rotulados. La eliminación de residuos debe hacerse según las instrucciones anteriores.
13. Las muestras o reactivos previamente congelados deben mezclarse bien y centrifugarse posteriormente después de descongelarlos y antes de los ensayos. Evite la producción de espuma y burbujas en las muestras o los reactivos.
14. Mantenga todos los reactivos, incluidas las enzimas y las mezclas maestras, en hielo o criobloques (de 2 a 8 °C) durante su uso.
15. Compruebe el correcto sellado de los tubos de muestras antes de la amplificación para impedir la evaporación durante los ciclos de variación térmica.
16. A causa de las diferencias inherentes en los mecanismos del funcionamiento del termociclador, puede producirse una variación en los resultados al transferir perfiles térmicos establecidos entre diferentes marcas y modelos de instrumentos



- termocicladores. En algunos casos, la especificidad y la sensibilidad de la reacción pueden verse afectadas, lo que puede provocar una interpretación y comunicación falsas de los datos. El usuario debe validar otros termocicladores y perfiles.
17. Durante el paso de elongación, las muestras deberán permanecer en el pocillo de reacción BeadChip, en la placa o en el portaobjetos.
 18. Los tiempos de incubación y las temperaturas distintas a las especificadas pueden dar resultados erróneos.
 19. El intervalo de concentración operativa de ADN del kit RHD BeadChip es de 10 a 80 ng/ μ l. El uso de concentraciones fuera de este intervalo puede provocar errores en los resultados de los alelos. En estudios internos llevados a cabo en BioArray durante el desarrollo de este ensayo, se produjeron errores en la llamada D negativa a una frecuencia baja, al analizar muestras a concentraciones superiores a 80 ng/ μ l. Si bien esto no se observó directamente con muestras de otros tipos de alelos, esto resalta la importancia de mantenerse dentro de los límites de concentración de 10 a 80 ng/ μ l.
 20. Las concentraciones contaminantes de ADN genómico de 2,5 ng/reacción (0,31 ng/ μ l y superiores son detectables por el kit RHD BeadChip). En nuestros estudios internos se observó que, en el caso de muestras híbridas de RHD-CE(4-7)-D, las concentraciones no detectables de ADN contaminante (inferiores a 2,5 ng/reacción) pueden provocar una llamada errónea de variantes fenotípicas.
 21. Aparecerán otras sondas en los resultados mostrados en la exportación y en la información del análisis de BASIS. Algunas de estas sondas son complementarias y algunas no se usan en el análisis. Los resultados de la exportación o del campo de información del análisis no deberán utilizarse para determinar la validez del procesado o de la muestra. La validez del procesado o de la muestra solo deberá basarse en los datos que aparecen en el informe de resumen de asignación que aparece en BASIS.
 22. Todos los días que vayan a usar AIS 400, antes de utilizarlo, los usuarios deberán realizar el procedimiento del ensayo de exposición de la bandeja (ETC) para verificar su funcionamiento. Si el ensayo de exposición resulta fallido, póngase en contacto con el servicio técnico para obtener las instrucciones adecuadas.


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136526-APN-DNPM#ANMAT


HEMOMEDICA S.R.L.
PABLO ZUCCHIN
Director Técnico
Página 148 de 174

V. TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los líquidos del kit RHD BeadChip, incluidas la mezcla de cebadores y todas las enzimas, se transportan en hielo seco. Cuando reciba el kit, compruebe que quede hielo seco en el envase. Si no hay hielo presente, no debe utilizarse y debe llamar al Servicio al Cliente de BioArray. Asimismo, póngase en contacto con el representante del servicio al cliente si la bolsa de la bandeja BeadChip sellada al vacío se ha abierto o dañado durante el transporte.

Guarde todos los reactivos del ensayo, incluidas la mezcla de cebadores y todas las enzimas, a una temperatura de -20 a -80 °C, en un congelador sin formación de escarcha. Cuando sea posible, utilice criobloques de sobremesa o hielo.

Guarde las bandejas BeadChip a una temperatura de 2-8 °C hasta su uso. Las bandejas sin usar deben devolverse de forma inmediata a su almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C en su envase original. Las bandejas BeadChip no se pueden reutilizar.

Consulte la fecha de caducidad de todos los componentes del kit. No utilizar después de la fecha de caducidad. El formato de la fecha de caducidad es AAAA-MM-DD. Los componentes de este kit pueden presentar una fecha de caducidad que es mayor que la fecha de caducidad de todo el kit. La vida útil más corta (esto es, la fecha de caducidad más temprana) de cualquier componente del kit se indica en la etiqueta externa del kit.

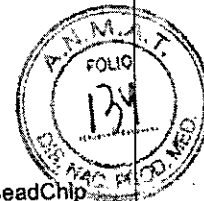
VI. RECOGIDA DE MUESTRAS

Muestra: Se recomienda extraer las muestras de sangre con tubos con anticoagulante EDTA (números de producto BD 366643, 368661, 367654). Se recomienda extraer las muestras de ADN con ayuda del kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (QIAGEN n.º de cat. 61104), de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. El uso de otros procedimientos requiere la validación del cliente.

Sustancias inferentes: La contaminación del ADN por inhibidores de la PCR, como citrato¹⁴, heparina¹⁴, hemoglobina, etanol, etc., puede interferir con la reacción de PCR.

Almacenamiento: El ADN genómico debe conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior, en un congelador sin formación de escarcha, hasta su uso. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.

Cantidad de ADN: Se requiere una concentración de 10 a 80 ng/µl de ADN genómico extraído para un rendimiento óptimo del kit RHD BeadChip. Use agua sin nucleasa para diluir muestras de ADN con una concentración superior a 80 ng/µl a unos límites de entre 10 y 80 ng/µl.



VII. PROCEDIMIENTO

A. Programación del termociclador

Asegúrese de que la opción de tapa calefactada esté seleccionada.

Programa PCR RHD:

95 °C 15 min

94 °C 30 s, desnivel del 39 %
65 °C 45 s, desnivel del 39 %
72 °C 45 s, desnivel del 39 % } 10 ciclos

94 °C 30 s, desnivel del 39 %
61 °C 45 s, desnivel del 39 %
72 °C 45 s, desnivel del 39 % } 25 ciclos

72 °C 3 min
4 °C ∞ (no más de 72 horas)

Programa "Limpieza de RHD" (RHD Clean Up):

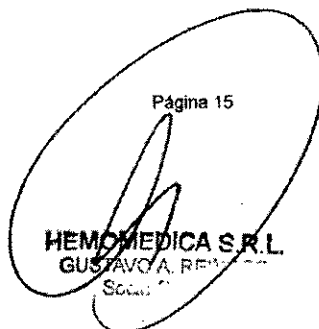
37 °C 15 min
85 °C 20 min
4 °C ∞ (no más de 3 horas)

Programa de generación de diana monocatenaria de RHD:

37 °C 20 min
85 °C 8 min
4 °C ∞ (no más de 3 horas)

B. Notas acerca del procedimiento

1. Asegúrese de que el termociclador Veriti esté programado previamente para cada uno de los pasos de amplificación de la PCR y procesamiento después de la PCR, tratamiento con amplicones, y generación de la diana monocatenaria. Antes de cada paso, asegúrese de seleccionar el perfil preprogramado adecuado.
2. El sistema de obtención de imágenes de la matriz AIS 400 de BioArray Solutions y el horno de hibridación (Boekef Inside-Out modelo 241000) deben encenderse al menos 30 minutos antes de su funcionamiento. Coloque dos papeles absorbentes en la bandeja del horno de hibridación y satúrelos con un total de 25 ml de agua para mantener las condiciones de humedad durante la incubación. Si el horno de hibridación se ha usado anteriormente durante el día, deseche los papeles absorbentes usados, coloque dos papeles nuevos y satúrelos como antes, con un total de 25 ml de agua.


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REMÓN
Soc. S. R. L.

3. Descontaminación de la zona de procesamiento:
 - a) Si se utiliza una campana con luz ultravioleta, descontamínala, encendiendo la luz UV durante 15 a 20 minutos como mínimo o
 - b) limpie las superficies de la zona de procesamiento con lejía al 10 % o con DNA Away, incluidas:
 - (i) las superficies de la sobremesa y del interior de la campana,
 - (ii) el equipo de apoyo,
 - (iii) todas las pipetas de trabajo, monocal y multicanal,
 - (iv) el interior de la tapa de la centrifugadora Mini Mouse, las gradillas de los tubos y las cubiertas, y
 - (v) las superficies del termociclador y de la centrífuga de placas:
 - o Limpie el interior de la tapa y los pocillos de la placa del termociclador con DNA Away (o equivalente), según las instrucciones del fabricante.
4. Retire las bandejas BeadChip de su medio de conservación y colóquelas a temperatura ambiente antes de usarlas.
5. Deben emplearse pipetas multicanal o de monocal, en función de las preferencias del laboratorio.

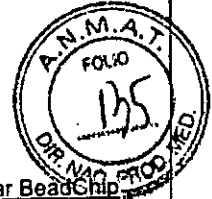
C. Preparación de la mezcla maestra para la PCR

1. Determine el número de muestras y controles a procesar.
2. Se precisa un control negativo por cada procesado. Se recomienda el uso de una muestra bien caracterizada como control positivo por cada procesado.
3. Por cada tanda de análisis, prepare una mezcla maestra de PCR, usando los volúmenes que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Preparación de la mezcla maestra para la PCR: volúmenes de los reactivos

Hasta la muestra n.º	1	8	16	24	32	40	48
Mezcla para PCR RHD eMAP (µl)	16	144	296	448	592	736	880
HotStarTaq DNA Polymerase (µl)	1,0	9,0	18,5	28,0	37,0	46,0	55,0

4. Designe un tubo sin nucleasa, de tamaño adecuado y etiquetado correctamente para la mezcla maestra para PCR de trabajo.
5. Extraiga la mezcla para PCR RHD eMAP del congelador a -20 °C y descongélela a temperatura ambiente durante un máximo de 30 minutos. Una vez descongelada la mezcla para PCR RHD, mézclela en un criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo.
6. Extraiga HotStarTaq DNA Polymerase del congelador a -20 °C y colóquela en un criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo.



7. Agite en vórtice la mezcla para PCR RHD eMAP y HotStarTaq DNA Polymerase durante 3 a 5 segundos, para mezclarlas.
8. Centrifugue la mezcla para PCR RHD eMAP y HotStarTaq DNA Polymerase para llevar las soluciones al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm, 5 segundos).
9. Con ayuda de una pipeta con una punta resistente a aerosoles, obtenga una alícuota de volumen adecuado de la mezcla para PCR RHD eMAP y HotStarTaq DNA Polymerase en el tubo sin nucleasa.
10. Devuelva inmediatamente la mezcla para PCR RHD eMAP y HotStarTaq DNA Polymerase sin usar para su conservación en el congelador a -20 °C.
11. Agite en vórtice la mezcla maestra para PCR durante 3 a 5 segundos, para mezclarla.
12. Centrifugue la mezcla maestra para PCR para trabajo con el fin de llevar la solución al fondo del tubo (aproximadamente 1000 rpm, 5 segundos).
13. Mantenga la mezcla maestra para PCR en un criobloque (conservado a 4 °C) o hielo, y úsela de inmediato.

D. Amplificación de la PCR

Procesamiento por tandas

Si se procesan pequeñas tandas de muestras (p. ej., 16 o menos muestras y testigos), el usuario puede transferir la mezcla maestra para PCR de trabajo directamente del frasco a los tubos de PCR de pared fina etiquetados o a la placa siguiendo el volumen descrito en el paso n.º 2 de este apartado y ayudándose de una pipeta de canal único con punta resistente a aerosoles (con filtro).

1. Coloque una alícuota de volumen correcto de mezcla maestra para PCR de trabajo (consulte la tabla 5) en cada tubo de una tira de 8 tubos, con una pipeta con punta resistente a aerosoles (con filtro). Mientras se efectúan estos pasos, la tira de 8 tubos deberá conservarse en un criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo.

Tabla 5: Mezcla maestra para PCR de trabajo: volúmenes de transferencia

Hasta la muestra n.º	16	24	32	40	48
Volumen (µl) por tubo en tira	37,0	57,0	76,0	94,0	112,0

2. Con ayuda de una pipeta de 8 canales con una punta resistente a aerosoles (con filtro), pipetee 17,0 µl de mezcla maestra para PCR de trabajo de la tira de 8 tubos, en los tubos para PCR de pared fina y etiquetados. Deseche la mezcla maestra para PCR de trabajo sin usar.

3. Selle los tubos para PCR de pared fina con los tapones o el precinto adecuados, y transpórtelos a la zona de adición de ADN, fuera de la estación de trabajo de la zona previa a la PCR.
4. Retire con cuidado los tapones o el precinto de los tubos para PCR de pared fina. Con ayuda de una pipeta con una punta resistente a aerosoles (con filtro) separada, para cada muestra, pipetee 8,0 µl de muestras preparadas de ADN en los tubos adecuados para PCR, de pared fina y etiquetados, y mezcle, pipeteando hacia arriba y abajo, tres veces. La mezcla maestra para PCR de trabajo y la muestra deben mantenerse en un criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo, durante el proceso de transferencia de la muestra.
5. Para el control negativo, use una pipeta con una punta resistente a aerosoles (con filtro), pipetee 8,0 µl de control negativo en el tubo adecuado para PCR, de pared fina, y mezcle, pipeteando hacia arriba y abajo, tres veces. La mezcla maestra para PCR de trabajo y el control negativo deben conservarse en un criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo.
6. Selle con cuidado los tubos para PCR de pared fina, con los tapones o el precinto adecuado; mezcle con cuidado, agitando en vórtice durante 3 a 5 segundos.
7. Centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm, 5 segundos).
8. Coloque los tubos para PCR de pared fina sellados en el termociclador Veriti de Applied Biosystems y ejecute el perfil de PCR que se muestra a continuación, con la tapa calefactada activada. Compruebe que el protocolo PCR para la amplificación de RHD esté programado correctamente y seleccionado.

95 °C	15 min	} 10 ciclos
94 °C	30 s, desnivel del 39 %	
65 °C	45 s, desnivel del 39 %	
72 °C	45 s, desnivel del 39 %	

94 °C	30 s, desnivel del 39 %	} 25 ciclos
61 °C	45 s, desnivel del 39 %	
72 °C	45 s, desnivel del 39 %	

72 °C	3 min
4 °C	hasta la extracción, pero no más de 72 horas

9. Extraiga los tubos de producto post-PCR de pared fina del termociclador y centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm durante 5 segundos).

Nota: Las muestras y los controles centrifugados deberán usarse de inmediato, pero pueden conservarse a una temperatura de -20 °C (o inferior) durante un máximo de cuatro semanas.



E. Procesamiento después de la PCR: tratamiento con amplicones

1. Etiquete correctamente un nuevo conjunto de tubos para PCR de pared fina para todas las muestras y controles.
2. Si se usa el producto post-PCR congelado, retire los tubos de PCR de pared fina del congelador a -20 °C y descongélelos a temperatura ambiente durante un máximo de 30 minutos.
3. Mezcle el producto post-PCR, descongelado, agitando en vórtice durante 3 a 5 segundos.
4. Centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm durante 5 segundos).
5. Retire Clean-up Reagent del congelador a -20 °C y mézclelo con cuidado, agitándolo en vórtice durante 3 a 5 segundos.
6. Centrifugue para llevar la solución al fondo del tubo (aproximadamente 1000 rpm durante 5 segundos).
7. Coloque Clean-up Reagent en un criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo.
8. Transfiera el producto posterior a la PCR a tubos de pared fina nuevos. Retire con cuidado los tapones o el precinto de los tubos de PCR de pared fina y, con ayuda de una pipeta (o pipeta de 8 canales) con una punta separada, resistente a aerosoles (con filtro) por cada muestra o control, pipetee 6,5 µl de cada muestra y control al fondo de los tubos nuevos de PCR de pared fina. Los nuevos tubos de PCR de pared fina deberán colocarse en un criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo. Selle y devuelva al congelador los tubos restantes originales de producto post-PCR.

Procesamiento por tandas

Si se procesan pequeñas tandas de muestras (por ejemplo, 16 muestras y controles o menos), el usuario puede transferir Clean-up Reagent directamente del frasco a los tubos para PCR de pared fina nuevos usando el volumen y el procedimiento de mezcla que se describen posteriormente en el paso 10, con ayuda de una pipeta de canal único con puntas resistentes a aerosoles (con filtro), usando una punta de pipeta resistente a aerosoles (con filtro) independiente por cada muestra y control.

9. Obtenga una alícuota del volumen adecuado de Clean-up Reagent (consulte la tabla 6) en cada tubo de una tira de 8 tubos, con ayuda de una pipeta con punta resistente a aerosoles (con filtro). Devuelva inmediatamente Clean-up Reagent sin usar al congelador a -20 °C. Coloque la tira de 8 tubos en un criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo.

Tabla 6: Volúmenes de Clean-up Reagent

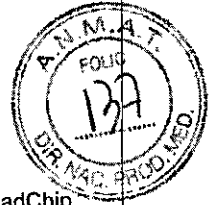
Hasta la muestra n.º	16	24	32	40	48
Volúmen (µl) de Clean-up Reagent por tubo en tira	6,0	9,0	12,0	14,0	16,0

10. Con ayuda de una pipeta de 8 canales con una punta resistente a aerosoles (con filtro), pipetee 2,0 µl de Clean-up Reagent de la tira de 8 tubos de cada muestra y control en los tubos para PCR de pared fina nuevos, y mézclelo pipeteando hacia arriba y abajo tres veces. Use un conjunto separado de puntas de pipeta resistentes a aerosoles (con filtro) por cada conjunto de 8 muestras y controles. Deseche la tira de 8 tubos que contiene Clean-up Reagent sin usar.
11. Selle con cuidado los tubos para PCR de pared fina, con los tapones o el precinto adecuado, mezclando con cuidado, agitando en vórtice durante 3 a 5 segundos, y centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm, 5 segundos).
12. Coloque los tubos para PCR de pared fina sellados en el termociclador Veriti de Applied Biosystems y ejecute el perfil siguiente: Compruebe que el protocolo para el procesamiento post-PCR, tratamiento con amplicones esté programado correctamente y seleccionado.
 - 37 °C 15 min
 - 85 °C 20 min
 - 4 °C hasta la extracción, pero no más de tres (3) horas
13. Extraiga los tubos para PCR de pared fina del termociclador y centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm, 5 segundos).

Nota: Las muestras y controles centrifugados deberán usarse inmediatamente, aunque también pueden conservarse a -20 °C durante un máximo de 24 horas.

F. Procesamiento post-PCR: generación de la diana monocatenaria

1. Si se usan muestras y controles congelados, retire los tubos de PCR de pared fina del congelador a -20 °C y descongéelos a temperatura ambiente durante un máximo de 30 minutos.
2. Retire la Lambda Exonuclease del congelador a -20 °C y descongélela a temperatura ambiente durante un máximo de 30 minutos.
3. Una vez descongelada la Lambda Exonuclease, colóquela de nuevo en criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo.



4. Mezcle con cuidado, agitando en vórtice, durante 3 a 5 segundos, y centrifugue para llevar la solución al fondo del tubo (aproximadamente 1000 rpm durante 5 segundos).

Procesamiento por tandas

Si se procesan pequeñas tandas de muestras (p. ej., 16 o menos muestras y controles), el usuario puede transferir la Lambda Exonuclease directamente del frasco a los tubos de PCR de pared fina siguiendo el volumen y el procedimiento de mezclado que se describe en el paso 6 a continuación.

5. Obtenga una alícuota del volumen adecuado de la Lambda Exonuclease (consulte la tabla 7) en cada tubo de una tira de 8 tubos, usando una pipeta con una punta resistente a aerosoles (con filtro). Coloque la tira de 8 tubos en un criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo. Devuelva inmediatamente la Lambda Exonuclease sin usar al congelador a -20 °C.

Tabla 7: Volúmenes de Lambda Exonuclease

Hasta la muestra n.º	16	24	32	40	48
Volumen de Lambda Exonuclease (µl) por tubo en tira	6,0	9,0	12,0	14,0	16,0

6. Con ayuda de una pipeta de 8 canales con punta resistente a aerosoles (con filtro), pipetee 2,0 µl de Lambda Exonuclease en cada muestra o control y mézclela pipeteando hacia arriba y abajo tres veces. Use un conjunto separado de puntas de pipeta resistentes a aerosoles (con filtro) por cada conjunto de 8 muestras y controles. Deseche la tira de 8 tubos que contiene Lambda Exonuclease sin usar.
7. Selle con cuidado los tubos para PCR de pared fina con los tapones o el precinto adecuados.
8. Mezcle con cuidado, agitando en vórtice, durante 3 a 5 segundos, y centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm durante 5 segundos).
9. Coloque los tubos para PCR de pared fina sellados en el termociclador Veriti de Applied Biosystems y ejecute el perfil siguiente. Compruebe que el protocolo para el procesamiento posterior a la PCR: generación de la diana monocatenaria esté programado correctamente y seleccionado.
- 37 °C 20 min
85 °C 8 min
4 °C hasta la extracción, pero no más de 3 horas
10. Extraiga los tubos para PCR de pared fina del termociclador y centrifugue para llevar la solución al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 rpm, 5 segundos).

Nota: Las muestras y controles monocatenarios centrifugados deberían usarse inmediatamente, pero pueden conservarse a -20 °C durante un máximo de 16 horas.

G. Elongación de la matriz en BeadChip

Nota: Los pasos de este apartado deberán efectuarse de manera continua y sin interrupciones.

1. Abra e inicie el programa AISR. Extraiga el CD de datos de la bandeja de RHD de la caja de bandejas de BeadChip y cargue los archivos del CD de datos en el ordenador (Nota: esto debe hacerse una vez por cada kit).
2. El reactivo de elongación deberá extraerse del congelador para descongelarlo a temperatura ambiente, durante un máximo de 30 minutos, durante el paso de incubación del reactivo de la Lambda Exonuclease.
3. Una vez descongelado, el reactivo de elongación deberá mantenerse en un criobloque (conservado a 4 °C) o en hielo.
4. Extraiga suficientes bandejas de RHD 8-BeadChip de la nevera y deje que se calienten a temperatura ambiente durante un máximo de 30 minutos.
5. Etiquete correctamente cada bandeja para su seguimiento durante y después del procesamiento.
6. Si se usan muestras y controles congelados, retire los tubos de PCR de pared fina del congelador a -20 °C y descongéelos a temperatura ambiente durante un máximo de 30 minutos.
7. Centrifugue para llevar el producto monocatenario al fondo de los tubos (aproximadamente 1000 durante 5 segundos).
8. Mezcle con cuidado el reactivo de elongación, agitando en vórtice durante 3 a 5 segundos. Evite la formación de espuma en la eMAP Elongation Mix.
9. Centrifuge para llevar la solución al fondo del tubo (aproximadamente 1000 rpm durante 5 segundos).

Procesamiento por tandas

Si se procesan tandas pequeñas de muestras (por ejemplo, 16 muestras y controles o menos), el usuario puede transferir la mezcla de elongación directamente del frasco a los tubos para PCR de pared fina con las muestras y los productos control, usando el volumen y el procedimiento de mezcla descritos posteriormente en el paso 10, con ayuda de una pipeta con un canal único con puntas resistentes a aerosoles (con filtro), usando una punta de pipeta independiente resistente a aerosoles (con filtro) por cada muestra y control.



10. Obtenga una alícuota del volumen adecuado del reactivo de mezcla de elongación (consulte la tabla 8) en cada tubo, en una tira de 8 tubos, usando una pipeta con una punta resistente a aerosoles (con filtro). Devuelva inmediatamente el reactivo de mezcla de elongación sin usar al congelador a -20°C .

Tabla 8: Volúmenes de eMAP Elongation Mix

Hasta la muestra n.º	16	24	32	40	48
Volumen de la eMAP Elongation Mix por tubo (μl)	25,0	36,0	47,0	59,0	70,0

11. Con ayuda de una pipeta de 8 canales con puntas resistentes a aerosoles (con filtro), pipetee $10,0\ \mu\text{l}$ de reactivo de mezcla de elongación en cada muestra y control y mézclelo pipeteando hacia arriba y abajo tres veces. Use un conjunto separado de puntas de pipeta resistentes a aerosoles (con filtro) por cada conjunto de 8 muestras y controles. Deseche la tira de 8 tubos que contiene el reactivo de mezcla de elongación sin usar.
12. Con ayuda de una pipeta de ocho canales con una punta separada por cada tubo en el cual se acaba de añadir el reactivo de mezcla de elongación, transfiera $18,0\ \mu\text{l}$ de cada muestra y testigo a la matriz correspondiente en la bandeja RHD 8-BeadChip. Deseche los tubos de muestra y control.
13. Coloque las bandejas RHD 8-BeadChip en el horno de hibridación e incúbelas durante 30 minutos a 55°C .
14. Extraiga las bandejas RHD 8-BeadChip del horno y lave la mezcla de elongación de las superficies de la matriz, sosteniendo las láminas o la placa para que su superficie quede vertical sobre un recipiente de recogida. Aclare cada BeadChip individualmente bajo una corriente de lavado BeadChip a presión constante. La corriente de agua debe dirigirse perpendicularmente a la cara del portaobjetos desde aproximadamente una pulgada de distancia, para enjuagar el centro de cada BeadChip. Aclare cada BeadChip durante 3 segundos.
15. Extraiga el agua restante de las bandejas RHD 8-BeadChip, usando aire comprimido o encapsulado.
Nota: No agite el aire comprimido.
16. Retire cualquier exceso de agua de la parte posterior de la bandeja del BeadChip con un paño de limpieza desechable.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOS
Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
PAUL ZUCCHETTI
Director Técnico
Página 58 de 74

H. Adquisición de imágenes de BeadChip

1. Abra e inicie el programa AISR en el escritorio.
2. Ejecute el procedimiento del ensayo de exposición de la bandeja (ETC, Exposure Test Carrier) (consulte el manual del usuario de AIS 190-20185). Si los resultados no son los indicados en las especificaciones, póngase en contacto con BioArray para ajustar el tiempo de exposición antes de continuar.
3. Extraiga el CD de datos de RHD de la caja de bandejas BeadChip y cargue los archivos del CD en el ordenador para cada lote nuevo.
4. Lea las bandejas RHD BeadChip con el sistema de obtención de imágenes de la matriz AIS 400 de BioArray. Procese los datos de BeadChip con el programa informático de análisis de RHD de BASIS.
5. Apague correctamente el AISR y la fuente de luz después de su uso.
6. Pase a BASIS para realizar la asociación de muestras y generar informes de BeadChip.

**VIII. RESULTADOS ESPERADOS****A. Evaluación: Control de calidad****Validez del procesado**

Para determinar si la ejecución es válida, deberá incluirse un control negativo en cada ejecución. Se recomienda un control positivo con genotipo o fenotipo conocido, que deberá suministrar el laboratorio. La interpretación de los controles positivos y negativos se hace de la manera siguiente:

Tabla 9: Criterios de validez del procesado

Control	Resultado	Interpretación
Muestra de control positivo (PCS) Muestra de fenotipo conocido (suministrada por el laboratorio)	Fenotipo previsto	El procesado es válido si el control negativo también es válido.
	Fenotipo no esperado	El procesado no es válido y todos los ensayos deben repetirse.
	Mensaje de advertencia de HB, CV, AP o control interno (IPC)	
Resultado de IC		
Control negativo (NC)	≥ 30 resultados de LS en el informe de fenotipo	El procesado es válido si la PCS también es válida.
	< 30 resultados de LS en el informe de fenotipo	El procesado no es válido y el ensayo debe repetirse.
	Mensaje de advertencia de HB o CV	

Notas:

- Si al calificar un control positivo usted obtiene de manera constante un resultado de IC, sustituya el control positivo.
- Si el número de SNP que muestran llamadas LS en el control negativo es el que se ha especificado anteriormente, el aspecto de las llamadas no LS en los SNP restantes no indica contaminación, según lo determinado en estudios internos llevados a cabo en BioArray durante el desarrollo del análisis.

Se espera un mensaje de advertencia de IPC no válido con la muestra de control negativo. El procesado debe considerarse válido si se cumplen las condiciones de la tabla 9.

Si el frasco de control negativo se contamina, llame al servicio de atención al cliente de BioArray.

Otras sondas aparecerán en los resultados presentados en BASIS en la función de exportación del botón "Información del análisis" de la ventana Genotipo. Algunas de estas sondas son

complementarias y algunas no se usan en el análisis en esta versión del programa informático. Los resultados de la función de exportación no deberán usarse al determinar la validez de la ejecución o la muestra. La validez del procesado o de la muestra solo deberá basarse en los datos que aparecen en el informe de resumen de asignación que aparece en BASIS.

Validez de la muestra

Para determinar si el resultado de la muestra es válido, la interpretación es de la siguiente manera:

Tabla 10: Criterios de validez de la muestra

Mensaje de advertencia	Resultado	Interpretación.
Controles positivos internos no válidos (IPC1) o (IPC2) o (IPC)	La variante se proporciona como "NTD". El genotipo se proporciona como "NTD" para todas las mutaciones.	La muestra debe repetirse.
HB		
CV		
AP		

Si no aparece ninguno de los mensajes de error anteriores, los resultados del ensayo son válidos.

B. Análisis de los resultados

El kit RHD BeadChip es un ensayo cualitativo. El sistema de información de BioArray Solutions (BASIS) calcula los datos de intensidad de la señal de la matriz de BeadChip por cada oligonucleótido que detecta marcadores específicos para identificar variantes asociadas.

Todos los cálculos se realizan mediante el programa informático de análisis RHD de BioArray Solutions, en el sistema de información de BioArray Solutions (BASIS).

Informe del genotipo

La siguiente lista (tabla 11) muestra los posibles resultados que pueden aparecer en el informe del genotipo:

Tabla 11: Posibles resultados que aparecerán en el informe del genotipo

Resultado	Significado
AA	Homocigótica para A
AB	Heterocigótica
BB	Homocigótica para B
Ax	Llamada indeterminada en B
xB	Llamada indeterminada en A
xx	Llamada indeterminada en A y B
LS	Señal baja en A y B
LS ⁺	Señal baja debido a la eliminación del gen o debido a región híbrida, es decir, RHD-RHCE-RHD



Notas sobre el informe del genotipo

La llamada "AB" para psiD (In3-19 37 bp) no es un indicador de heterocigosidad. Las llamadas BB en F223V (667 T>G) y Y269X (807 T>G) indican RHDpsi homocigótico y AB en F223V (667 T>G) e Y269X (807 T>G) indica RHDpsi heterocigótico.

Informe de asignación de tipificaciones

La página de asignación de tipificación indica asignaciones de variante/alelo, enumeradas por chip y muestra. La siguiente lista (tabla 12) muestra los posibles resultados que pueden aparecer en el informe de asignación de tipificaciones.

Tabla 12: Posibles resultados que aparecerán en el informe de asignación de variantes

Resultado	Significado
Variante X	Homocigótico o heterocigótico para la variante X
Variante X/variante Y	Heterocigótico para las variantes X e Y.
IC	Llamada indeterminada (consulte las notas a continuación).
NTD	No se ha determinado ninguna tipificación.

Notas sobre el informe de asignación de variantes

- En caso de un resultado de IC la vista "Mostrar detalles" proporciona dos o más variantes posibles con la puntuación de confianza de la asignación obtenida por el algoritmo de análisis bayesiano. El usuario puede elegir una de las variantes proporcionadas de acuerdo con cualquier información adicional (por ejemplo, grupo étnico) que esté disponible para esa muestra.
- Las variantes se muestran según la abreviatura convencional y la nomenclatura de la ISBT.

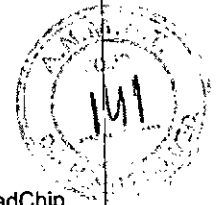
Mensajes de advertencia

En algunos casos, si se determina que los datos del ensayo que se analizan están fuera de los límites esperados del análisis, aparecerá un mensaje de advertencia de dos o tres letras en lugar de una asignación de tipificación. También puede aparecer un mensaje de advertencia para las muestras, junto con las asignaciones efectuadas por el algoritmo de análisis bayesiano. Los mensajes de advertencia se muestran en la siguiente tabla (13):


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. BEINOSO
Socio Gerente

Tabla 13: Mensajes de advertencia que pueden aparecer en los informes de asignación de genotipos o variantes

Advertencia	Significado	Explicación
Ax	Llamada de genotipo indeterminado	Indica que las intensidades de la señal de un marcador hicieron que la muestra cayera en una "zona gris", por lo que el genotipo está parcialmente resuelto.
xB	Llamada de genotipo indeterminado	Indica que las intensidades de la señal de un marcador hicieron que la muestra cayera en una "zona gris", por lo que el genotipo está parcialmente resuelto.
xx	Llamada de genotipo indeterminado	Indica que el ruido o la incertidumbre para un marcador determinado están sobre un umbral preestablecido, específico del lote, para proporcionar un genotipo de alta confianza. Varios marcadores con mensajes de advertencia xx pueden estar acompañados de NTD en la columna de variante fenotípica. Consulte la sección "NTD" de esta tabla para mitigación.
LS	Señal baja	Indica que la intensidad de la señal de ambas sondas de un marcador determinado es inferior a un valor de corte de intensidad preestablecido y específico del lote, debido al diseño o a razones como una concentración baja. Los mensajes de advertencia LS pueden ir acompañados de NTD en la columna de variante fenotípica. Consulte la sección "NTD" de esta tabla para mitigación.
IC	Llamada indeterminada	Indica una ambigüedad entre dos o más asignaciones posibles de variante fenotípica con puntuaciones de confianza comparables. Las posibles acciones de mitigación de este error son las siguientes: El enlace Revisar detalles proporciona a los usuarios la opción para seleccionar manualmente la variante más probable basada en su población de ensayo. En los casos en los que una llamada IC está acompañada de uno o más genotipos LS/xx/Ax/xB, siga los pasos para repetir el análisis, tal y como se explica en la sección "NTD" de esta tabla.
AP	Patrón anómalo	Indica que el patrón del marcador medido es diferente de los patrones que el programa informático wRHD de BioArray puede detectar en más de un número preestablecido de posiciones de marcadores. Los marcadores que muestran los genotipos LS/xx/Ax/xB contribuyen a una llamada AP. La variante fenotípica se muestra como "NTD". <ul style="list-style-type: none"> • Si una llamada AP está acompañada de varias llamadas LS/xx/Ax/xB, lo más probable es que el error esté relacionado con el rendimiento y deberá repetirse tal y como se explica en la sección "NTD" de esta tabla. • En caso contrario, la muestra analizada podría contener un



Advertencia	Significado	Explicación
		alelo no detectable por el kit BeadChip.
HB	Fondo elevado	Indica que la intensidad de fondo es superior a una intensidad de corte preestablecida y específica del lote para el BeadChip individual. La variante fenotípica se muestra como "NTD". Consulte la sección "NTD" de esta tabla para mitigación.
CV	Coefficiente de variación	Indica que, para una muestra determinada, el porcentaje de marcadores para los que se detectan una o ambas sondas con CV > 30 % es superior a un límite preestablecido de puntos porcentuales. Las llamadas de las variantes fenotípicas se muestran como "NTD". Consulte la sección "NTD" de esta tabla para mitigación.
IPC1, IPC2 o IPC no válido	Control positivo interno no válido 1, 2 o ambos	Las intensidades inferiores al valor de corte correspondientes a las sondas de control positivo interno indican una eficiencia total baja de la PCR. Consulte la sección "NTD" de esta tabla para mitigación.
NTD	No se ha determinado ninguna tipificación.	Indica que no se ha determinado la tipificación debido a: i) un error de HB o CV, como se ha explicado anteriormente, ii) un mensaje de advertencia AP, como se ha explicado anteriormente, y iii) un fallo total de la muestra, indicado por intensidades bajas de uno o ambos controles de PCR internos en el grupo. Las posibles acciones de mitigación de este error son las siguientes: <ul style="list-style-type: none">• Asegúrese de que la concentración de ADN sea de 10 a 80 ng/μl, especialmente si se detectan intensidades bajas, como en iii), más arriba.• Repita el ensayo desde el paso Procesamiento post-PCR, tratamiento con amplicones (XIV) del procesamiento del ensayo con el producto de la PCR conservado a -20 °C. Preste una atención especial a la manipulación de los reactivos, las técnicas de pipeteo y la posible contaminación.• Si persiste el mensaje de advertencia, repita el ensayo a partir de la amplificación de la PCR (paso XII), usando el ADN conservado a -20 °C. Asegúrese de que la concentración de ADN se encuentre entre 10 y -80 ng/μl.• Si el mensaje de advertencia continúa, llame al servicio técnico o al representante de Immucor para obtener ayuda.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. RAMOS

IF-2019:75136525-APN-DNPM#ANMAT

IX. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Esta versión para IVD del kit RHD BeadChip no está disponible para utilización comercial en Estados Unidos.
2. En el caso de una muestra determinada, las mutaciones concretas imprevistas en la sonda o en la región de unión del cebador pueden repercutir en la exactitud del resultado correspondiente a dicha muestra.
3. La frecuencia relativa de los alelos se basa en un modelo que refleja la población de Estados Unidos y tal vez no se aplique a grupos de subpoblaciones específicas. En consecuencia, los usuarios desearán tener en cuenta la subpoblación específica a partir de la cual se obtuvo la muestra al analizar la pauta del genotipo presentada por el programa informático para dicha muestra.
4. No todas las variantes de RHD se identifican mediante el kit RHD BeadChip. Las tablas 2 y 3 del apartado II, más arriba, muestran los alelos D detectados por el kit RHD BeadChip. Los alelos negativos D no detectados están en la tabla 14. Los alelos D parciales no detectados están en la tabla 15. Los alelos D débiles no detectados están en la tabla 16.



Tabla 14: Alelos negativos RHD no detectados por el ensayo RHD BeadChip

Nombre del alelo	Detalle del nombre del alelo
RHD*01N.02	RHD*CE(1-9)-D
RHD*01N.03	RHD*CE(2-9)-D
RHD*01N.05	RHD*CE(2-7)-D
RHD*01N.09	RHD*121T,643C,646C,998C
RHD*01N.10	RHD*270A
RHD*01N.11	RHD*325delA
RHD*01N.12	RHD*449delT
RHD*01N.13	RHD*487delACAG
RHD*01N.14	RHD*554A
RHD*01N.15	RHD*635T
RHD*01N.16	RHD*711delC
RHD*01N.17	RHD*652delA,653G
RHD*01N.19	RHD*933A
RHD*01N.20	RHD*941T
RHD*01N.21	RHD*990G
RHD*01N.22	RHD*1203A
RHD*01N.23	RHD*343delC
RHD*01N.24	RHD8IVS2+1G>A
RHD*01N.25	RHD*IVS2-1g>a
RHD*01N.26	RHD*IVS8+1g>a
RHD*01N.27	RHD*906ins,IVS6
RHD*01N.28	RHD*970del3,976del16

Tabla 15: Alelos D parciales no detectados por el ensayo RHD BeadChip

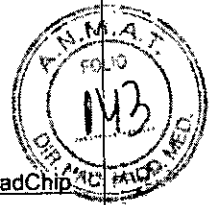
Nombre o categoría común	Nombre del alelo	Detalle del nombre del alelo
DII	RHD*02 RHD*DII	RHD*1061A
DVII RH:40 (Ter+)	RHD*07.01 RHD*DVII.1	RHD*329C
DVII de tipo 2	RHD*07.02 RHD*DVII.2	RHD*307C,328C
	RHD*D débil 4.2.2	RHD*602G,667G, 744T,1025C
DAU0	RHD*10.00 RHD*DAU0	RHD*1136T
DAU6	RHD*10.06 RHD*DAU6	RHD*998A,1136T
DAU7	RHD*10.07 RHD*DAU7	RHD*835A,998A, 1136T
DFW	RHD*18 RHD*DFW	RHD*497C
DHO	RHD*20 RHD*DHO	RHD*704C
Débil parcial 21	RHD*21 RHD*D débil parcial 21	RHD*938T
DHR	RHD*22 RHD*DHR	RHD*686A
DMH	RHD*23 RHD*DMH	RHD*161C
DNAK	RHD*24 RHD*DNAK	RHD*1070A
DNU	RHD*26 RHD*DNU	RHD*1057A
DDE	RHD*27 RHD*DDE	RHD*120A
DFL	RHD*28 RHD*DFL	RHD*494G
DYU (DQC)	RHD*29 RHD*DYU	RHD*700T
DTO	RHD*30 RHD*DTO	RHD*667G,674T
DVL1	RHD*31 RHD*DVL1	RHD*del684-686
DVL2	RHD*32 RHD*DVL2	RHD*del705-707
DWI (DWLE)	RHD*33 RHD*DWI	RHD*1073C
DIM (DileM)	RHD*34 RHD*DIM	RHD*854A
DMA	RHD*35 RHD*DMA	RHD*621C
DLO	RHD*36 RHD*DLO	RHD*851T

Página 31

HEMOMEDICA S.R.L.
 GUSTAVO A. REINOSO
 Socio Gerente

Tabla 16: Alelos D débiles no detectados por el ensayo RHD BeadChip.

Fenotipo	Nombre del alelo	Detalle del nombre del alelo
Tipo 2.1	RHD*01W.2.1 RHD*D débil de tipo 2.1	RHD*301T, 1154C
Tipo 6	RHD*01W.6 RHD*D débil de tipo 6	RHD*29A
Tipo 7	RHD*01W.7 RHD*D débil de tipo 7	RHD*1016A
Tipo 8	RHD*01W.8 RHD*D débil de tipo 8	RHD*919A
Tipo 9	RHD*01W.9 RHD*D débil de tipo 9	RHD*880C
Tipo 10	RHD*01W.10 RHD*D débil de tipo 10	RHD*1177C
Tipo 12	RHD*01W.12 RHD*D débil de tipo 12	RHD*830A
Tipo 13	RHD*01W.13 RHD*D débil de tipo 13	RHD*826C
Tipo 16	RHD*01W.16 RHD*D débil de tipo 16	RHD*658C
Tipo 18	RHD*01W.18 RHD*D débil de tipo 18	RHD*19T
Tipo 19	RHD*01W.19 RHD*D débil de tipo 19	RHD*611C
Tipo 20	RHD*01W.20 RHD*D débil de tipo 20	RHD*1250C
Tipo 22	RHD*01W.22 RHD*D débil de tipo 22	RHD*1224C
Tipo 23	RHD*01W.23 RHD*D débil de tipo 23	RHD*834T
Tipo 24	RHD*01W.24 RHD*D débil de tipo 24	RHD*1013C
Tipo 25	RHD*01W.25 RHD*D débil de tipo 25	RHD*341A
Tipo 26	RHD*01W.26 RHD*D débil de tipo 26	RHD*26A
Tipo 27	RHD*01W.27 RHD*D débil de tipo 27	RHD*661T
Tipo 28	RHD*01W.28 RHD*D débil de tipo 28	RHD*1152C
Tipo 30	RHD*01W.30 RHD*D débil de tipo 30	RHD*1018A, 1019T
Tipo 31	RHD*01W.31 RHD*D débil de tipo 31	RHD*17T
Tipo 32	RHD*01W.32 RHD*D débil de tipo 32	RHD*1121T
Tipo 33	RHD*01W.33 RHD*D débil de tipo 33	RHD*520A
Tipo 35	RHD*01W.35 RHD*D débil de tipo 35	RHD*260A
Tipo 36	RHD*01W.36 RHD*D débil de tipo 36	RHD*842G
Tipo 37	RHD*01W.37 RHD*D débil de tipo 37	RHD*399T
Tipo 38	RHD*01W.38 RHD*D débil de tipo 38	RHD*833A
Tipo 39	RHD*01W.39 RHD*D débil de tipo 39	RHD*1015A
Tipo 42	RHD*01W.42 RHD*D débil de tipo 42	RHD*1226T
Tipo 43	RHD*01W.43 RHD*D débil de tipo 43	RHD*605C
Tipo 44	RHD*01W.44 RHD*D débil de tipo 44	RHD*728G
Tipo 45	RHD*01W.45 RHD*D débil de tipo 45	RHD*1195A
Tipo 46	RHD*01W.46 RHD*D débil de tipo 46	RHD*1221A
Tipo 48	RHD*01W.48 RHD*D débil de tipo 48	RHD*182T
Tipo 49	RHD*01W.49 RHD*D débil de tipo 49	RHD*770T
Tipo 50	RHD*01W.50 RHD*D débil de tipo 50	RHD*727A
Tipo 52	RHD*01W.52 RHD*D débil de tipo 52	RHD*92C
Tipo 53	RHD*01W.53 RHD*D débil de tipo 53	RHD*740G
Tipo 54	RHD*01W.54 RHD*D débil de tipo 54	RHD*365T
Tipo 55	RHD*01W.55 RHD*D débil de tipo 55	RHD*895G
Tipo 56	RHD*01W.56 RHD*D débil de tipo 56	RHD*65A
Tipo 57	RHD*01W.57 RHD*D débil de tipo 57	RHD*640T
Tipo 58	RHD*01W.58 RHD*D débil de tipo 58	RHD*1006C
Tipo 59	RHD*01W.59 RHD*D débil de tipo 59	RHD*1148C
Tipo 60	RHD*01W.60 RHD*D débil de tipo 60	Delección RHD* 1219-1224
Tipo 61	RHD*01W.61 RHD*D débil de tipo 61	RHD*28T
Tipo 62	RHD*01W.62 RHD*D débil de tipo 62	RHD*661A
Tipo 63	RHD*01W.63 RHD*D débil de tipo 63	RHD*758A
Tipo 64	RHD*01W.64 RHD*D débil de tipo 64	RHD*881T
Tipo 65	RHD*01W.65 RHD*D débil de tipo 65	RHD*68A
Tipo 66	RHD*01W.66 RHD*D débil de tipo 66	RHD*916A
Tipo 67	RHD*01W.67 RHD*D débil de tipo 67	RHD*722T
Tipo 68	RHD*01W.68 RHD*D débil de tipo 68	RHD*165C, 1213G
Tipo 69	RHD*01W.69 RHD*D débil de tipo 69	RHD*953A
Tipo 70	RHD*01W.70 RHD*D débil de tipo 70	RHD*1012G
Tipo 71	RHD*01W.71 RHD*D débil de tipo 71	RHD*29C
Tipo 72	RHD*01W.72 RHD*D débil de tipo 72	RHD*1212A
Tipo 73	RHD*01W.73 RHD*D débil de tipo 73	RHD*1241T
Del	RHD*01EL.02 RHD*DEL2	RHD*3A
Del	RHD*01EL.03 RHD*DEL3	RHD*53C
Del	RHD*DEL4	RHD*147delA
Del	RHD*205 RHD*DEL5	RHD*1VS1+1G>A
Del o D débil	RHD*206 RHD*DEL6	RHD*251C



Del o D débil	RHD*207 RHD*DEL7	RHD*410A
Del o D negativa	RHD*209 RHD*DEL9	RHD*1VS3+2T>A
Del	RHD*DEL10	RHD*1222C
Del	RHD*211 RHD*DEL11	RHD*1252insT
Del	RHD*DEL12	RHD*458C
Del o D negativa	RHD*DEL13	RHD*785delA

5. El kit RHD no puede diferenciar entre las formas homocigótica o heterocigótica de alelos.
6. El kit RHD no puede detectar alelos híbridos en una combinación heterocigótica con otros alelos, cuando el alelo híbrido no tiene ningún otro marcador característico fuera de la región híbrida.
7. La intensidad inespecífica de la señal relacionada con las sondas en la región de exones híbridos puede causar la imposibilidad de identificar omisión de exón en muestras híbridas o deleción de RHD.
8. El kit RHD no incorpora marcadores en la región del exón 8 y del exón 10. Por tanto, no se detectarán los alelos que tienen marcadores característicos únicamente en el exón 8 (p. ej., DAU-0) o en el exón 10.
9. En los casos en los que dos llamadas de variantes fenotípicas no se pueden resolver porque el ensayo carece del marcador que permite la discriminación, el sistema mostrará el resultado como "variante X" o "variante Y", p. ej., DAU-5 o DV de tipo 1 (véase la tabla 2).
10. En el caso especial en que 667 T>G (F223V) es un genotipo BB, el marcador 676 G>C (A226P) puede tener solo genotipos LS. En consecuencia, el programa informático wRHD tal vez no pueda distinguir entre DV de tipo 6 y DBS-0.
11. En los casos en los que aparecen mensajes de error 'xx' en marcadores críticos para una llamada de variante, ello puede tener como consecuencia que esa variante se tipifique como Possible D u otra variante.

Página 33

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA MICCHINI
Dir. Área Técnica
12/12/2015
Página 168 de 174

X. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Cuatro centros europeos independientes de análisis clínicos evaluaron el kit RHD BeadChip. Se analizaron un total de 492 muestras con el kit RHD BeadChip y otros métodos de referencia, incluidos la serología u otros ensayos moleculares (SSP). Es importante tener en cuenta que las muestras se seleccionaron específicamente para alcanzar una cobertura máxima de las variantes objetivo del análisis RHD BeadChip. El kit RHD BeadChip presenta las características del rendimiento siguientes:

Tabla 17: Características del rendimiento general del kit RHD BeadChip.

Método de referencia	Porcentaje de concordancia
Secuenciación	95 % (135/142)
Serología	98,3 % (121/123)**
SSP	94,6 % (212/224)***

- * Solo se utilizan muestras válidas para el cálculo del porcentaje de concordancia.
- ** 2 muestras discordantes fueron positivas para el gen RHD, pero negativas para el antígeno debido a una mutación no detectada por el kit RHD BeadChip.
- *** Tanto el método SSP como el kit RHD BeadChip presentaron una tasa de error del 2,6 % en las llamadas a las variantes adecuadas.

Tabla 18: Sensibilidad y especificidad de la detección de positivo D, D parcial, D débil y negativos D por el kit RHD BeadChip.

		Referencia	
		Possible D ^a	Variante
RHD BeadChip	Possible D ^a	72	8 ^b
	Variante	0	408

Sensibilidad de Possible D = 100 %, especificidad = 90 %

- § El método de referencia tipificó como DNB (2 muestras), D débil tipo 2 (3 muestras), DAI-4 (1 muestra) y D negativa (2 muestras) ocho muestras tipificadas possible D por el kit RHD BeadChip.

		Referencia	
		Otras llamadas	D débil
RHD BeadChip	Otras llamadas	213	1 ^b
	D débil	0	266

Sensibilidad de D débil = 98,5 %, especificidad = 100 %

- § El método de referencia tipificó como D débil de tipo 29 una muestra tipificada DAR por el kit RHD BeadChip.



		Referencia	
		Otras llamadas	D parcial
RHD BeadChip	Otras llamadas	363	3 ^s
	D parcial	0	116

Sensibilidad de D parcial = 93,5 %, especificidad = 100 %

§ El método de referencia tipificó como DVII, DAU-4 y D débil de tipo 29 tres muestras tipificadas como DV de tipo 2 (o DBS1), posible D/DAU1 y DV de tipo 2 (DBS1) por el kit RHD BeadChip, respectivamente.

		Referencia	
		Otras llamadas	D negativa
RHD BeadChip	Otras llamadas	454	2 ^s
	D negativa	1	24

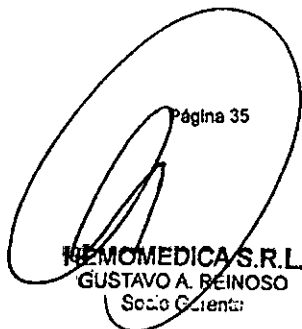
Sensibilidad de negativo D = 92,6 %; especificidad = 96,1 %

§ El método de referencia dio un resultado negativo D a dos muestras tipificadas como posible D por el kit RHD BeadChip.

* El método de referencia tipificó como DHAR una muestra tipificada RHD D por BeadChip.

De acuerdo con los resultados de la evaluación del rendimiento, puede producirse una señal baja en uno o más SNP, en la región exón 7 o puede producirse una señal baja en uno o más SNP, en la región exón 9, en las siguientes variantes que son tipificadas como Possible D u otra variante:

- DNB
- DIV de tipo 4
- DIVb-2
- D débil de tipo 2
- D débil de tipo 41
- Del RHD (1227G>A)


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. BEINOSO
Socio Científico

IF-2019-75186525-APN-DNPM#ANMAT
PABLA ZUCCHINI
Directora Técnica
ANMAT 12 R5F

Tabla 19: Recuentos de variantes detectadas en el estudio de evaluación del rendimiento del kit RHD BeadChip.

Variantes	N.º de muestras
DAR (hemicigoto u homocigoto)	21
DAR/DIIIIa-CE(4-7)-D	6
DAU1 (hemicigoto u homocigoto)	2
DAU2 (hemicigoto u homocigoto)	1
DAU3 (hemicigoto u homocigoto)	2
DAU5 o DV de tipo 1 o DBS2 (hemicigoto u homocigoto)	5
DFR o DFR3 (hemicigoto u homocigoto)	2
DFR2 (hemicigoto u homocigoto)	12
DIIIIa (hemicigoto u homocigoto) o DIIIIa/DIIIIa-CE(4-7)-D	10
DIIIIa-CE(4-7)-D (hemicigoto u homocigoto)	4
DIIIIc (hemicigoto u homocigoto)	3
DIV de tipo 4 (hemicigoto u homocigoto)	1
DIVa de tipo 2 (hemicigoto u homocigoto) o DIVa de tipo 2/DIIIIa-CE(4-7)-D	5
DNB (hemicigoto u homocigoto)	14
DV de tipo 2 o DBS1 (hemicigoto u homocigoto)	3
DVI (hemicigoto u homocigoto)	35
possible D (hemicigoto u homocigoto)	77
possible D/DAU3	1
possible D/DAU5 o DV de tipo 1 o DBS2	1
possible D/DIVa de tipo 2	1
possible D/DNB	1
possible D/DOL o DOL2	1
possible D/RHD psi	4
possible D/D débil de tipo 4.0 o 4.3	3
Eliminación de RHD	18
Deleción de RHD (posible rG)	7
RHD psi/DAU4 o DV de tipo 5	1
RHD psi/DIIIIa-CE(4-7)-D	1
RHD psi/DOL o DOL2	2
RHD psi/DV de tipo 9	1
RHD-CE(3-9)-D (hemicigoto u homocigoto)	31
D débil de tipo 1 (hemicigoto u homocigoto)	98
D débil de tipo 11 (hemicigoto u homocigoto)	16
D débil de tipo 15 (hemicigoto u homocigoto)	7
D débil de tipo 2 (hemicigoto u homocigoto)	52
D débil de tipo 2/D débil de tipo 3	3
D débil de tipo 3 (hemicigoto u homocigoto)	20
D débil de tipo 4.0 o 4.3 (hemicigoto u homocigoto)	21
D débil de tipo 4.0 o 4.3/DIIIIa o DIIIIa-CE(4-7)-D	1
D débil de tipo 4,1 (hemicigoto u homocigoto)	6
D débil de tipo 5 (hemicigoto u homocigoto)	15



Tabla 20: Alelos que se declara que son detectados por el kit RHD BeadChip, pero no encontrados en el juego de muestras del estudio de evaluación del funcionamiento.

1227A (Del), RHD-CE(3-7)-D, RHD-CE(4-7)-D, 48A (W16X), 807G (Y269X), D débil de tipo 14 o 40 o 51 D débil de tipo 17, D débil de tipo 47, D débil de tipo 29, D débil de tipo 34, D débil de tipo 41, DIIIb, DIII de tipo 4, DIII de tipo 6 o DIII de tipo 7, DIII de tipo 7, DIVa, DIV de tipo 3, DIV de tipo 5 o DIVb, DIVb, DBS0, DV de tipo 4, DV de tipo 6, DV de tipo 8, DAR-E, DOL3, DBT1, DBT2, DCS1 o DFV, DCS2, DFR4, DHMi IVS3+1G>A (Del), DUC2 RHCE(1-3)-D(4-10), ceHAR

Reproducibilidad

Para los estudios de precisión, se suministraron muestras con codificación ciega (n = 6) a 4 centros independientes de análisis clínicos. En cada centro, el mismo usuario examinó 3 veces las muestras, en tres días distintos (variabilidad intraanálisis). Todos los centros obtuvieron resultados con una concordancia del 100 % con las tipificaciones de referencia, todos los días. La reproducibilidad multilote también se hizo internamente en un grupo enmascarado de 15 muestras, con una concordancia del 100 % con las tipificaciones de referencia.

Ensayos para las sustancias de interferencia

Se observó que las siguientes sustancias no interfieren con el kit RHD BeadChip.

Microorganismos: Se examinaron los microorganismos siguientes a 10^6 UFC por ml de sangre

Bacillus subtilis, Corynebacterium diphtheria y jeikeium, Escherichia coli, Propionibacterium acnes, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Staphylococcus epidermidis, haemolyticus y aureus, Streptococcus pneumonia y mitis, Aspergillus niger, Candida albicans. Se analizaron también concentraciones citopáticas del virus de la gripe y no se observó ninguna interferencia.

Sustancias exógenas: Amoxicilina ($2,06E + 02 \mu\text{mol/l}$), sal potásica de penicilina G ($2,73 \mu\text{g/ml}$), hidroxurea ($3,50 \mu\text{g/ml}$), paracetamol ($1,32E \mu\text{mol/l}$), ibuprofeno ($2,43 \mu\text{mol/l}$), ácido acetilsalicílico ($3,62E \mu\text{mol/l}$), naproxeno ($2,17E \mu\text{mol/l}$), clopidogrel (Plavix) ($3,00E \mu\text{mol/l}$), warfarina ($3,25E \mu\text{mol/l}$), loratadina ($7,80E \mu\text{mol/l}$), atorvastatina (Lipitor) ($5,48E + 2 \mu\text{mol/l}$), fenilefrina HCl ($4,91E \mu\text{mol/l}$), nadolol ($3,88E \mu\text{mol/l}$), ácido fólico (vit. B) ($1,50E + 1 \mu\text{mol/l}$), ácido ascórbico (vit. C) ($3,42E \mu\text{mol/l}$)

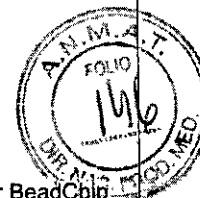
Sustancias endógenas: Valores patológicos de hemoglobina (hasta 500 g/l), bilirrubina (hasta 67 mg/dl), triglicéridos (hasta 1000 mg/dl) y proteínas totales (hasta 90 g/l)

Página 87

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Soc. C. S. R. L.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 10.^a ed. Oxford, Blackwell Science, 1997.
- [2] Avent ND, Reid ME. "The Rh group system: a review", *Blood*, 2000, 95: 375-387.
- [3] Reid ME. "Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification". *Transfusion* 2003;43:1748-57.
- [4] Reid ME, Lomas-Francis C. *The Blood Group Antigen FactsBook*. 2.^a ed. San Diego: Academic Press; 2003.
- [5] ISBT - Terminology for Blood Type Alleles: Página actualizada el 22-Oct-2010: <http://ibgri.blood.co.uk/ISBTPages/AlleleTerminology/Allele-Terminology.htm>.
- [6] Daniels GL, Faas BHW, Green CA, Smart P, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, Zondervan HA, von dem Borne A.E.G.Kr, van der Schoot CE. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion*. 1998 Oct, 38:951-958.
- [7] D negatives and DEL alleles: <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>.
- [8] Westhoff, C. M., Vege, S., Halter-Hipsky, C., Whorley, T., Hue-Roye, K., Lomas-Francis, C. and Reid, M. E. (2010), DIIIa and DIII Type 5 are encoded by the same allele and are associated with altered RHCE*ce alleles: clinical implications. *Transfusion*, 50: 1303-1311.
- [9] Alleles with stop codons. <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>
- [10] Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet*. 2001; 2: 10.
- [11] Huang CH. Alteration of *RH* gene structure and expression in human dCCee and DCW- red blood cells: phenotypic homozygosity versus genotypic heterozygosity. *Blood*. 1996;88:2326-2333.
- [12] Faas BHW, Beckers EAM, Simsek S, Overbeeke MAM, Pepper R, van Rhenen DJ, von dem Borne AEGK, van der School CE. Involvement of Ser103 of the Rh polypeptides in G epitope formation. *Transfusion*. 1996;36:506-511.
- [13] Pham BN, Peyrard T, Juszcak G, Dubeaux I, Gien D, Blancher A, Cartron JP, Rouger P, Le Pennec PY. Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hr B-, Hr B- phenotype in black persons. *Transfusion*. 2009 Mar;49(3):495-504.
- [14] García M, Blanco J, Caballero J, Gargallo-Viola D. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 40, No 4, Apr 2002, 1567-1568.



Patentes

Todos los bienes y servicios se venden sujetos a las cláusulas de ventas de BioArray Solutions Ltd. y están cubiertos por uno o más de los siguientes: números de patente 6 797 524; 7 427 512; 7 335 153; 7 390 676; EP1311839B1 (pendiente de patentes adicionales).

La compra de este producto otorga al comprador derechos sobre determinadas patentes de Roche, con el fin de utilizarlas únicamente para proporcionar servicios de diagnóstico *in vitro* para humanos. La compra no concede ninguna patente general ni otra licencia de ningún tipo distintas de este derecho de uso concreto.

Este producto y su empleo están cubiertos por una o más de las patentes siguientes: EP 0 820 524, US 6 150 095, 6 307 039, 6 770 751 y 7 192 707, Jap 2006 246897 y patentes pendientes. El comprador solo recibe una licencia para practicar los métodos y procesos cubiertos por estas patentes cuando utilice este producto en solo en aplicaciones de inmunohematología molecular.

La ADN polimerasa Thermo Sequenase® de este producto está protegida por la patente de los Estados Unidos 5 614 365 y las patentes extranjeras equivalentes propiedad de Harvard College y cedidas bajo licencia en exclusiva a GE Healthcare, y la patente de los Estados Unidos 5 885 813 y las patentes extranjeras equivalentes propiedad de GE Healthcare. Solo para uso en investigación (no se incluye la investigación *in-vivo*) o para uso diagnóstico comercial *in-vitro*. No debe utilizarse en aplicaciones terapéuticas o *in-vivo*. Otros usos exigen licencias que pueden adquirirse de GE Healthcare Bio-Sciences Corp.

Marcas registradas

BeadChip, AIS, BASIS y eMAP son marcas registradas de BioArray Solutions Ltd.

HotStarTaq DNA Polymerase®, QIAcube, QIAamp y QIAGEN son marcas registradas de QIAGEN GmbH, Hilden (Alemania).

Veriti y GeneAmp son marcas registradas de Life Technologies Corporation.

DNA AWAY es una marca registrada de Molecular BioProducts, Inc.

InSlide Out es una marca registrada de Boekel Scientific

MiniMouse II es una marca registrada de Denville Scientific Inc.

MicroAmp es una marca registrada de Applied Biosystems Excel es una marca registrada de Microsoft Corporation

Thermo Sequenase es una marca registrada de GE Healthcare UK Limited.

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc., utilizados en este documento, aunque no aparezcan específicamente con la marca correspondiente, no se consideran desprotegidos por la ley.

Fabricante:

BioArray Solutions, Ltd.
35 Technology Drive, Suite 100
Warren, NJ 07059 EE. UU.
Teléfono (+1) 908 226-8200
Fax (+1) 908 226-0800

BASCustomerServiceNJ@immucor.com

<http://www.immucor.com>



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2019 - Año de la Exportación

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número: IF-2019-75136525-APN-DNPM#ANMAT

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Miércoles 21 de Agosto de 2019

Referencia: 3110-1713-17-4

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 174 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, c=AR, o=SECRETARIA DE GOBIERNO DE MODERNIZACION,
ou=SECRETARIA DE MODERNIZACION ADMINISTRATIVA, serialNumber=CUIT 30715117564
Date: 2019.08.21 15:39:28 -0300

Mariano Pablo Mancnti
Jefe I
Dirección Nacional de Productos Médicos
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología
Médica

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA -
GDE
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, c=AR,
o=SECRETARIA DE GOBIERNO DE MODERNIZACION,
ou=SECRETARIA DE MODERNIZACION ADMINISTRATIVA,
serialNumber=CUIT 30715117564
Date: 2019.08.21 15:39:58 -0300



Secretaría de
Gobierno de Salud



Ministerio de Salud y Desarrollo Social
Presidencia de la Nación

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO**

Expediente nº 1-47-3110-1713-17-4

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por HEMOMEDICA S.R.L., se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de nuevos productos para diagnóstico de uso in vitro con los siguientes datos característicos:

NOMBRE COMERCIAL: 1) PRECISE TYPE BEADCHIP TEST - HEA; 2) PRECISE TYPE BEADCHIP KIT - HEA; 3) ARRAY IMAGIN SYSTEM (AIS) - AIS 400 C; 4) ARRAY IMAGIN SYSTEM (AIS) - AIS 400 D; 5) HPA BEADCHIP™ KIT; 6) RHD BEADCHIP™ KIT; 7) RhCE BEADCHIP™ KIT.

INDICACIÓN DE USO: ENSAYOS CUALITATIVOS DISEÑADOS PARA LA DETERMINACIÓN MOLECULAR DE DIFERENTES ANTÍGENOS EN HEMATIES, ASOCIADOS A VARIANTES FENOTÍPICAS CLINICAMENTE SIGNIFICATIVAS.

FORMA DE PRESENTACIÓN: 1) Envases por 96 determinaciones, conteniendo: Mezcla para PCR HEA 1.2 (2 x 900 µl), Clean-up Reagent (1 x 330 µl), Lambda Exonuclease (1 x 330 µl), eMAP Elongation Mix (2 x 600 µl), HotStarTaq DNA Polymerase (1 x 155 µl), Control negativo (1 x 1000 µl), 12 bandejas x 8 matrices de BeadChip o 1 bandejas x 96 matrices de BeadChip; 2) Envases conteniendo:


Sedes y Delegaciones

Tel. (+54-11) 4340-0800 - <http://www.argentina.gob.ar/anmat> - República Argentina

Sede Central
Av. de Mayo 869, CABA

Sede Alsina
Alsina 665/671, CABA

Sede INAME
Av. Caseros 2161, CABA

Sede INAL
Estados Unidos 25, CABA

Sede Prod. Médicos
Av. Belgrano 1480, CABA

Deleg. Mendoza
Remedios de Escalada de
San Martín 1909, Mendoza
Prov. de Mendoza

Deleg. Córdoba
Obispo Trejo 635,
Córdoba,
Prov. de Córdoba

Deleg. Paso de los Libres
Ruta Nacional 117, km.10,
COTE.CAR., Paso de los Libres,
Prov. de Corrientes

Deleg. Posadas
Roque González 1137,
Posadas, Prov. de
Misiones

Deleg. Santa Fé
Eva Perón 2456,
Santa Fé,
Prov. de Santa Fé



"2019 - AÑO DE LA EXPORTACIÓN"

Secretaría de Gobierno de Salud



Ministerio de Salud y Desarrollo Social
Presidencia de la Nación

BeadCheck HEA Ref-pA y BeadCheck HEA Ref-pB; 3) No aplica; 4) No aplica; 5) Envases por 96 determinaciones, conteniendo: Mezcla para PCR HPA eMAP (2 x 900 µl), Clean-up Reagent (1 x 330 µl), Lambda Exonuclease (1 x 330 µl), eMAP Elongation Mix (2 x 600 µl), HotStarTaq DNA Polymerase (1 x 155 µl), Control negativo (1 x 1000 µl), 12 bandejas x 8 matrices de BeadChip; 6) Envases por 48 determinaciones, conteniendo: Mezcla para PCR RHD eMAP (1 x 900 µl), HotStarTaq DNA Polymerase (1 x 155 µl), Clean-up Reagent (1 x 330 µl), Lambda Exonuclease (1 x 330 µl), eMAP Elongation Mix (1 x 600 µl), Control negativo (1 x 1000 µl), 6 bandejas x 8 matrices de BeadChip; 7) Envases por 48 determinaciones, conteniendo: Mezcla para PCR RHCE eMAP (1 x 900 µl), HotStarTaq DNA Polymerase (1 x 155 µl), Clean-up Reagent (1 x 330 µl), Lambda Exonuclease (1 x 330 µl), eMAP Elongation Mix (1 x 600 µl), Control negativo (1 x 1000 µl), 6 bandejas x 8 matrices de BeadChip.

PERÍODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIÓN DE CONSERVACIÓN: 1) y 2) VEINTICINCO (25) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre -20 y 80 °C; 3) No aplica; 4) No aplica; 5) DIECIOCHO (18) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre -20 y -80 °C; 6) y 7) NUEVE (9) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre -20 y -80 °C.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: 1) a 4) IMMUCOR Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Straße 32. 63303 Dreieich. (ALEMANIA); 5) a 7) BIOARRAY SOLUTIONS LIMITED, 35 Technology Dr Ste 100. Warren, NJ 07059. (USA).

Sedes y Delegaciones

Tel. (+54-11) 4340-0800 - <http://www.argentina.gob.ar/anmat> - República Argentina

Sede Central
Av. de Mayo 869, CABA

Sede Alsina
Alsina 665/671, CABA

Sede INAME
Av. Caseros 2161, CABA

Sede INAL
Estados Unidos 25, CABA

Sede Prod. Médicos
Av. Belgrano 1480, CABA

Deleg. Mendoza
Remedios de Escalada de
San Martín 1909, Mendoza,
Prov. de Mendoza

Deleg. Córdoba
Obispo Trejo 635,
Córdoba,
Prov. de Córdoba

Deleg. Paso de los Libres
Ruta Nacional 117, km.10,
CO.TE.CAH., Paso de los Libres,
Prov. de Corrientes

Deleg. Posadas
Roque González 1137,
Posadas, Prov. de
Misiones

Deleg. Santa Fé
Eva Perón 2456,
Santa Fé,
Prov. de Santa Fé



Condición de Venta/Categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO
PROFESIONAL EXCLUSIVO

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO
PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO PM-1049-58

Expediente Nº 1-47-3110-1713-17-4

10 OCT 2019

Disposición Nº

8369

Dr. WALDO HORACIO BELLOSO
Subadministrador Nacional
A.N.M.A.T.

Sedes y Delegaciones

Tel. (+54-11) 4340-0800 - <http://www.argentina.gob.ar/anmat> - República Argentina

Sede Central
Av. de Mayo 869, CABA

Sede Alsina
Alsina 665/671, CABA

Sede INAME
Av. Caseros 2161, CABA

Sede INAL
Estados Unidos 25, CABA

Sede Prod. Médicos
Av. Belgrano 1480, CABA

Deleg. Mendoza
Remedios de Escalada de
San Martín 1909, Mendoza
Prov. de Mendoza

Deleg. Córdoba
Obispo Trejo 635,
Córdoba,
Prov. de Córdoba

Deleg. Paso de los Libres
Ruta Nacional 117, km.10,
COTE.CAR., Paso de los Libres,
Prov. de Corrientes

Deleg. Posadas
Roque González 1137,
Posadas, Prov. de
Misiones

Deleg. Santa Fé
Eva Perón 2456,
Santa Fé,
Prov. de Santa Fé