

PT

Instruções de utilização

Kits BAGene SSP

CE IVD

Kits de teste para a tipificação de grupos sanguíneos ABO, RH, sistemas Kell, Kidd e Duffy, MNS, sistemas raros de grupos sanguíneos, especificidades HPA e HNA numa base genética molecular

pronto a usar, pré-aliquotado

REF	6640	ABO-TYPE
REF	6641	ABO-TYPE variant
REF	6645	RH-TYPE
REF	6646	Partial D-TYPE
REF	6647	Weak D-TYPE
REF	6648	D Zygoty-TYPE
REF	6650	KKD-TYPE
REF	6652	MNS-TYPE
REF	6653	Rare-TYPE
REF	6660	HPA-TYPE
REF	66701	HNA-TYPE

Índice

1.	Descrição do produto	2
2.	Material	2
2.1	Conteúdo dos Kits BAGene	2
2.2	Material necessário, mas não incluído	3
2.3	Armazenamento e estabilidade	3
3.	Dados de desempenho	3
4.	Procedimento de teste	4
4.1	Condições de segurança e notas especiais	4
4.2	Isolamento de ADN	4
4.3	Amplificação	4
4.4	Eletroforese em gel	7
4.5	Documentação	7
4.6	Interpretação dos resultados e limitações do método	7
4.6.1	Geral	7
4.6.2	ABO-TYPE e ABO-TYPE variant	8
4.6.3	RH-TYPE	8
4.6.4	Partial D-TYPE	9
4.6.5	D Zygoty TYPE	9
5.	Avisos e precauções	9
6.	Resolução de problemas	10
7.	Referências	11
8.	Explicação dos símbolos usados nos rótulos	11

Versão: 11/2017 / Emissão: 2017-01

1. Descrição do produto

Os Kits BAGene são usados para a genotipagem das especificidades sanguíneas de dadores, recetores e mulheres grávidas com base na genética molecular. Os kits ABO- variante de ABO, RH-, D- parcial, D- fraco, Zigosidade D- e KKD-TYPE podem ser usados para genotipagem sem testes serológicos adicionais, salvo especificado em contrário (consulte as suas regulamentações nacionais).

O material básico para a tipificação com os Kits BAGene é ADN com leucócitos purificados. O procedimento de teste é feito usando Sequência Specific Primers (SSP)-PCR (ver Fig. 1). Este método baseia-se no facto de a extensão do iniciador e a conseqüente PCR bem-sucedida dependerem da correspondência exata com a extremidade 3' de ambos os iniciadores. Como resultado, a amplificação é obtida apenas se os iniciadores correspondem totalmente à sequência alvo. O produto da amplificação é subseqüentemente visualizado por eletroforese em gel de agarose.

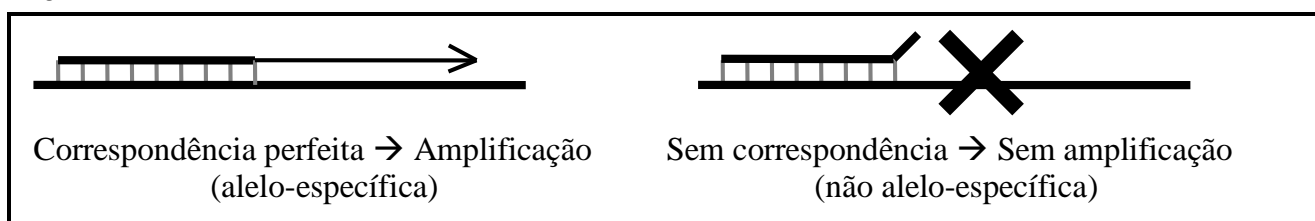


Fig. 1: Princípio de SSP-PCR

A composição das misturas do iniciador individual permite a identificação clara dos genótipos ABO, RH, KEL, JK, FY, MNSs, grupos sanguíneos raros, HPA e HNA indicados na respetiva ficha de trabalho. Através da tipificação, é usado um determinado número de misturas de reação pré-aliquotadas. É incluído em cada mistura de reação um controlo de amplificação interna.

2. Material

2.1 Conteúdo dos kits BAGene

- ◆ Placas/tiras de PCR para a genotipagem do grupo sanguíneo. As misturas de reação pré-aliquotadas e secas consistem em iniciadores alelo-específicos, iniciadores de controlo interno (específicos para o gene HGH (Human Growth Hormone) ou para uma sequência do cromossoma I (90 kbp 5' do Rhesus Box) e nucleótidos. A mistura de reação n.º 1 está marcada. O número de lote está impresso em cada placa/tira.
- ◆ 10x tampão de PCR
- ◆ 8 tampas de tiras
- ◆ Instruções de utilização, ficha de trabalho
- ◆ Informação para avaliação (apenas ABO-TYPE variant)

2.2 Material necessário, mas não incluído

- ◆ Happy Taq (REF 70976) (ou outra Taq-Polimerase, validada com os kits BAGene pelo utilizador).
A Happy Taq é fornecida gratuitamente quando encomendada conjuntamente com o Kit BAGene.
Não use uma taq polimerase de arranque a quente (p. ex., Ampli Taq Gold)!
- ◆ Kit **EXTRA GENE I** (REF 7059) (opcional) para a extração de ADN de sangue/ linfócitos/ leucócitos ou material para outros métodos de extração de ADN
- ◆ Pipetas operadas por pistão (0,5 - 250 µl)
- ◆ Pontas esterilizadas com filtro integrado
- ◆ Termociclador (lista de termocicladores validados, consultar página 6)
- ◆ ADN com agarose
- ◆ Tampão 0,5x TBE (45 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA)
- ◆ Brometo de etídio (EtBr)
- ◆ Unidade de eletroforese submarina

- ◆ Abastecimento energético (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ ADN com comprimento padrão (REF 7097)
- ◆ Fonte UV (transiluminador, 220-310 nm)
- ◆ Sistema de documentação a gel

2.3. Armazenamento e estabilidade

Os kits são entregues à temperatura ambiente e o Happy Taq com gelo seco. Após a entrega, armazene todos os reagentes a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. O prazo de validade é indicado no rótulo de cada reagente e é também válido para reagentes abertos. O prazo de validade indicado no rótulo exterior refere-se ao reagente com a estabilidade menor contido no kit. Descongele o tampão 10x de PCR pouco tempo antes da utilização.

3. Dados de desempenho

A composição da mistura de iniciador garante uma identificação fiável dos alelos indicados na ficha de trabalho com base nos dados da sequência atualmente conhecidos.

A precisão e capacidade de reprodução da especificidade de cada mistura de iniciador foram verificadas para cada lote com amostras de controlo do ADN com especificidades conhecidas. Os alelos, que não estão incluídos e que não foram testados atualmente por serem raros, são indicados na ficha de trabalho (nt = não testados atualmente).

Foram realizados estudos de desempenho com amostras de ADN previamente determinadas para todos os Kits BAGene. As investigações mostraram resultados claros de acordo com pré-tipificações serológicas e/ou genómicas. Não foram registadas discrepâncias durante os estudos. As amostras de ADN usadas para a avaliação e controlo de qualidade das misturas foram extraídas com os kits EXTRA GENE I (método de salgação) ou Qiagen (método baseado em coluna).

Os kits BAGene são validados com o Happy Taq (REF 70976). Ao usar outra Taq Polimerase, a enzima tem de ser validada com os kits BAGene pelo utilizador.

É garantida uma tipificação fiável usando 50 - 100 ng de ADN por mistura de reação. É representada uma exceção por D Zygosity-TYPE. Devido a um programa de PCR mais longo para este produto, deve ser usada uma concentração mais baixa de ADN de 30 - 50 ng por mistura de reação.

4. Procedimento de teste

4.1 Condições de segurança e notas especiais

A PCR é um método altamente sensível, que deve ser desempenhado por pessoal qualificado com experiência em técnicas de genética molecular e testes de grupos sanguíneos. As diretrizes atualizadas sobre medicina de transfusão, tipificação de grupos sanguíneos e anamnese de transfusão devem ser respeitadas de forma a reduzir o risco de tipificações falsas, especialmente quando são obtidos resultados diferentes com métodos serológicos e genéticos moleculares. A genotipagem das especificidades ABO, RHD/RHCE, Kell, Kidd e Duffy tem de ser feita após um teste serológico.

Respeite as medidas de segurança especiais de forma a evitar a contaminação e consequentes reações falsas:

- ◆ Use luvas durante o trabalho (sem pó, se possível).
- ◆ Use novas pontas com cada passo de pipetagem (com filtro integrado).
- ◆ Use áreas de trabalho separadas para a pré-amplificação (isolamento de ADN e preparação das reações) e pós-amplificação (eletroforese em gel, documentação); de preferência, use duas salas separadas.
- ◆ Use dispositivos e outros materiais apenas nos locais respetivos e não os troque.

4.2 Isolamento de ADN

O kit **EXTRA-GENE I** é adequado para o isolamento do ADN, pois pode ser obtido ADN puro a partir de sangue inteiro sem a utilização de solventes ou químicos tóxicos. Adicionalmente, os métodos comerciais baseados em coluna ou contas ou outros métodos descritos na literatura são adequados para indicar o ADN com pureza suficiente. A presença de heparina é um potencial inibidor da PCR. Por conseguinte, é recomendado o EDTA ou citrato de sangue para a tipificação.

O ADN deve ter os seguintes índices de pureza:

- $OD_{260}/OD_{280} = >1,5$ e $<2,0$ (indicador de contaminação com ARN/proteínas)
- $OD_{260}/OD_{230} = >1,8$ (indicador de contaminação com sal, hidratos de carbono ou solventes orgânicos)

4.3 Amplificação

Todas as misturas de reação pré-aliquotadas já contêm iniciadores alelo-específicos e controlo-específicos e nucleótidos. Estas são fornecidas secas nos tubos de reação. Os parâmetros de amplificação são otimizados a um volume final de 10 µl.

1. Retire o número necessário de placas/tiras de ≤ -20 °C e descongele o tampão 10x de PCR.
2. Pipete a mistura principal, composta por um tampão 10x de PCR, solução de ADN, taq-polimerase e água destilada e misture bem. Os diferentes Kits BAGene trabalham com a mesma mistura principal e podem consequentemente ser combinados, exceto o D Zygotity-TYPE para o qual é recomendada outra concentração de ADN. A composição da mistura principal é indicada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição da mistura principal dependendo do número de misturas de reação

Número de misturas	Água Dest.	10x Tampão de PCR	Solução de ADN (50-100 ng/µl) ♠	Happy Taq (5 U/µl)	volume total
1	8	1	1	0,08	10 µl
2	16	2	2	0,2	20 µl
6☆	50	7	7	0,5	65 µl
7	70	9	9	0,7	90 µl
8	80	10	10	0,8	100 µl
9	88	11	11	0,9	110 µl
10	96	12	12	1,0	120 µl
11	104	13	13	1,0	130 µl
12	112	14	14	1,1	140 µl
13	128	16	16	1,3	160 µl
14	136	17	17	1,4	170 µl
15	144	18	18	1,4	180 µl
16	152	19	19	1,5	190 µl

⇒ Para diferentes concentrações de ADN, as quantidades da solução de ADN e água devem variar em conformidade (p. ex., para 12 misturas: ADN (120 ng/µl): usar 5,8 µl ADN e 119 µl de água dest.). Se for usada outra Taq Polimerase, a enzima tem de ser validada com os kits BAGene pelo utilizador.

☆ É recomendada a preparação mínima de uma mistura principal para 6 misturas de reação devido ao volume reduzido de Taq-polimerase.

♠ Para **D Zygotity-TYPE** é recomendada uma concentração de ADN de **30 – 50 ng/µl**.

3. Depois de agitar com depuração centrífuga, adicione de imediato 10 µl desta mistura às misturas de reação pré-aliquotadas e secas. Mude a ponta após cada passo de pipetagem. Feche bem os tubos com as respectivas tampas. Assegure que não toca na parte interior das tampas, nem nas extremidades superiores dos tubos com os dedos para evitar contaminação. Se forem usados termocicladores com tampa de aperto, é também possível usar películas de PCR reutilizáveis. Agite ligeiramente a placa para baixo para dissolver os grânulos no fundo da placa. A solução de PCR completa deve estabelecer-se no fundo.
4. Coloque os tubos de reação no ciclador térmico e aperte a tampa para que os tubos da reação não se deformem com o calor. Inicie o programa de PCR. Não é necessário sobrepor as misturas de reação com óleo mineral se for usada uma cobertura aquecida e ajustada!

Marcação →	N.º de lote
	⑨
	⑩
	.
	.
	.
	.
	.
	.
	.

Parâmetros de amplificação para todos os Kits BAGene exceto D Zygotity-TYPE

Programa-passo	Tempo	Temp.	N.º de ciclos
Primeira desnaturação	5 min.	96 °C	1 ciclo
Desnaturação	10 seg.	96 °C	5 ciclos
Hibridização+extensão	60 seg.	70 °C	
Desnaturação	10 seg.	96 °C	10 ciclos
Hibridização	50 seg.	65 °C	
Extensão	45 seg.	72 °C	
Desnaturação	10 seg.	96 °C	15 ciclos
Hibridização	50 seg.	61 °C	
Extensão	45 seg.	72 °C	
Extensão final	5 min.	72 °C	1 ciclo

Termocicladores validados

PTC 200 / C1000
(MJ Research/ BioRad)

GeneAmp PCR-System
9700 (usar taxa de aquecimento de 9600),
Veriti (ABI)

Mastercycler epGradient
S (usar função "simular
gradiente Mastercycler")
(Eppendorf)

Tprofessional (Biometra)

ATENÇÃO: Programa de PCR diferente!

Parâmetros de amplificação para D Zygotity-TYPE

Programa-passo	Tempo	Temp.	N.º de ciclos
Primeira desnaturação	10 min.	95 °C	1 ciclo
Desnaturação	20 seg.	92 °C	35 Ciclos
Hibridização	30 seg.	64 °C	
Extensão	5 min.	68 °C	
Extensão final	5 min.	72 °C	1 ciclo

Termocicladores validados

Ver parâmetros de amplificação para os outros kits BAGene

Não use um bloco de aquecimento de alumínio (p. ex., GeneAmp PCR-System 9700)!

Ao usar termocicladores com uma taxa de aquecimento e arrefecimento muito rápida, recomenda-se o uso de uma taxa de aquecimento e arrefecimento mais lenta (~2,5 °C/seg.).

Como os termocicladores de diferentes fabricantes têm um desempenho diferente e até dispositivos individuais de um tipo podem ser calibrados de forma diferente, pode ser necessário otimizar os parâmetros de amplificação.

Para otimizar o seu dispositivo, use as seguintes orientações:

Com reações **falso-positivas** (bandas não específicas, tipos adicionais): Aumente a temperatura de hibridização 1 °C por passo.

Com reações **falso-negativas** (bandas em falta): Diminua a temperatura de hibridização 1 °C por passo e/ou aumente os períodos de hibridização em 5 segundos e/ou aumente os períodos de desnaturação em 5 segundos por passo.

Recomenda-se usar apenas termocicladores calibrados regularmente. Para a verificação do termociclador, recomendamos o kit CYCLER CHECK (REF 7104, 71044).

4.4 Eletroforese em gel

A separação dos produtos de amplificação é feita por eletroforese através de um gel horizontal de agarose. Como tampão de eletroforese, é recomendado 0,5x TBE (45 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA). A concentração de gel deve ser de 2,0 - 2,5% de agarose. Deixe o gel polimerizar pelo menos 30 minutos antes de carregar as amostras.

Depois de a amplificação ter sido concluída, retire as amostras do termociclador e coloque as misturas de reação completas cuidadosamente em cada poço do gel. Adicionalmente, aplique 10 µl do comprimento padrão de ADN para comparação de tamanho. A separação de eletroforese é feita a 10 - 12 V/cm (com 20 cm de distância entre os elétrodos (aproximadamente 200 - 240 V), durante 20 - 40 minutos. É recomendado um funcionamento durante 40 minutos para melhorar a separação das bandas usando D Zygosity-TYPE. Após o funcionamento ter sido concluído, o gel é tingido numa solução de brometo de etídio (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr em H₂O ou tampão TBE). Como alternativa, pode também ser adicionado EtBr (0,5 µg/ml) ao tampão de eletroforese ou ao gel de agarose. Se necessário, o excesso de EtBr pode ser removido imergindo o gel em H₂O durante 20 - 30 minutos.

4.5 Documentação

Para documentação, visualize a amplificação da PCR usando um transiluminador UV (220-310 nm) e fotografe-o com um sistema adequado de documentação a gel. Escolha o tempo de exposição e a abertura para que as bandas sejam esticadas ao máximo e se destaquem contra o fundo negro (abertura aproximada de 11, tempo de exposição de 1 segundo). Os resultados são documentados na ficha de trabalho fornecida (ver ponto 4.6)

4.6 Interpretação dos resultados e limitações do método

4.6.1 Geral

Os resultados obtidos com os kits BAGene são documentados nas fichas de trabalho fornecidas. Nas fichas de trabalho, as características, especificidades, fenótipos e genótipos são listados numa tabela e um exemplo de um padrão de reação serve para suportar a interpretação. As preparações da PCR têm números de reação (p. ex., ABO-TYPE n.º 1 - 8). Por baixo dos números de reação na ficha de trabalho, está indicado o comprimento do fragmento dos produtos específicos PCR em bp. Nas linhas abaixo, são apresentados possíveis padrões de banda no gel. Produtos de PCR específicos (reações positivas) são designados como + e as caixas

correspondentes do diagrama têm um fundo colorido. ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygosity-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, Rare-TYPE, HPA-TYPE e HNA-TYPE são destacados a **cinzento**, RH-TYPE adicional a **vermelho**, **verde** e **azul**. A avaliação dos padrões de reação é levada a cabo nas linhas da esquerda para a direita.

Apenas as bandas que mostram o tamanho correto em correlação com o comprimento padrão do ADN devem ser consideradas como positivas. Os tamanhos corretos dos amplificadores específicos podem ser encontrados na ficha de trabalho. Em todas as faixas sem amplificação alelo-específica, o controlo interno tem de aparecer a **434 bp**. As exceções são a **D Zygosity-TYPE** e a reação de PCR com a **mistura n.º 2 de RH-TYPE** que mostram um controlo interno de **659 bp**. Na maioria dos casos em que há uma amplificação alelo-específica, o controlo interno é mais fraco ou ausente! Relativamente a resultados inapropriados, consulte a resolução de problemas (ver ponto 6).

Se não puder ser obtido um resultado claro com os kits BAGene (p. ex., devido a alelos desconhecidos que não podem ser detetados com os iniciadores existentes), devem ser seguidas as diretrizes de transfusão nacionais de acordo com as tipificações serológicas. É recomendada a análise sequencial destas amostras. Os resultados de tipificação devem ser interpretados tendo em consideração a variação genética de diferentes grupos étnicos. Em caso de dúvida, o fenótipo é válido.

4.6.2 ABO-TYPE e ABO-TYPE variant

A expressão homozigótica dos alelos *ABO*O01*, *ABO*O03*, *ABO*B101*, *ABO*A201* é indicada por bandas na reação PCR correspondente (1, 3, 5 ou 7). Em heterozigosidade, as quatro "não reações" têm de ter uma banda no gel (2, 4, 6 e 8) além de duas preparações de PCR específicas (1, 3, 5, 7). A homozigosidade do alelo *ABO*A101* é indicada apenas por bandas nas quatro "não reações" (2, 4, 6, 8), pois não há uma preparação específica para *ABO*A101*. A constelação heterozigótica de *ABO*A101* pode ser reconhecida por uma banda adicional das reações alelo-específicas (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16).

Como apenas uma seleção de alelos de variante A pode ser detetada pela ABO-TYPE variant, outros alelos de variante A podem ser ocultados pelo resultado PCR **ABO*A101**. Como apenas uma seleção de alelos de variante B e nenhum alelo de variante A² pode ser detetado pela ABO-TYPE variant, outros alelos de variante B ou variante A² podem ser ocultados pelos resultados da PCR **ABO*B101** e **ABO*A201** respetivamente. A maioria dos alelos B^(A) e *cis AB* também mostra um resultado positivo na reação *ABO*B101*.

Uma banda específica para HGH com um comprimento de fragmento de 434 bp aparece como controlo interno.

São providenciadas explicações detalhadas numa informação adicional para a avaliação da ABO-TYPE variant em cada kit. Consulte também as notas especiais nas fichas de trabalho sobre o ABO-TYPE e ABO-TYPE variant.



4.6.3 RH-TYPE

A tipificação genética molecular do padrão *RHD* assim como de algumas variantes de *RHD* (*RHD* - haplotipos positivos em espécimes serológicos D negativos, D parcial) é desempenhada em reações de PCR designadas.



As preparações 1 e 2 são reações Multiplex-PCR para examinar cinco polimorfismos de *RHD* (*RHD* intrão 4 e 7, exão 7, assim como a deteção específica de *RHD* (W16X) e *RHD*Ψ). Isto significa que, ao contrário de todos os outros kits BAGene (exceto no caso da banda de controlo interno) podem ocorrer não só um, como também dois produtos de amplificação específicos numa reação PCR. Para facilitar a avaliação, as caixas respetivas são divididas quando aparecem duas bandas possíveis e têm um fundo de duas cores. Os comprimentos dos fragmentos do produto PCR e os polimorfismos são também identificados com uma cor específica de acordo com as caixas para o padrão de reação.

Exemplo de *RHD* Ψ :

Preparação N.º 1: Duas bandas específicas têm de aparecer no gel.

- Produto PCR **224 bp** – identificação a **verde**, padrão de reação  numa caixa com fundo **verde**.
- Produto PCR **123 bp** – identificação a **azul**, padrão de reação  numa caixa com fundo **azul**.

Preparação N.º 2: Duas bandas específicas têm de aparecer no gel.

- Produto PCR **154 bp** – identificação a **vermelho**, padrão da reação  numa caixa com fundo **vermelho**.
- Produto PCR **390 bp** – identificação a **verde**, padrão de reação  numa caixa com fundo **verde**.

As reações PCR designadas são para a tipificação genética molecular das características do gene locus *RHCE*. Uma banda, específica para HGH, com um comprimento de fragmento de 434 bp, aparece como controlo interno. Uma exceção é a reação PCR n.º 2, em que uma banda de controlo aparece a 659 bp (específica para a sequência genómica de cromossoma I, 90 kbp 5' da *Rhesus Box*).

Se um padrão de reação indicar uma categoria D, deve ser efetuada uma análise aprofundada usando **Partial D-TYPE** de forma a excluir as mutações pontuais como causa destes resultados.

4.6.4 Partial D-TYPE

Uma banda em falta na reação n.º 4 pode indicar DFR (serologia: positivo fraco com anti-D) ou *RHD* Ψ (negativo hemi ou homocigótico D em serologia). Se a informação serológica estiver em falta, a confirmação ou exclusão do *RHD* Ψ pode ser obtida usando RH-TYPE. Na presença do tipo D 41 e 45 fraco, pode ocorrer uma reação em falta da mistura n.º 9. As mutações de secções de intrões podem também levar a uma reação em falta na mistura n.º 8 ou 9. Na presença de tipo D 20 fraco, a reação n.º 10 não mostra normalmente uma banda, mas, por vezes, aparece uma banda fraca.

Não é atualmente possível efetuar uma diferenciação genética molecular das variantes D **DCS**, **DFW**, **DIM**, **DNU** do *RHD* padrão. A consideração dos haplotipos é útil.

4.6.5 D Zygotyposity-TYPE

Para alelos *RHD*, que não podem ser determinados serologicamente (RhD neg.), pode ocorrer uma discrepância entre o resultado do teste serológico e a genotipagem. A deteção positiva do *Rhesus Box* Downstream mostra a presença de um alelo *RHD* (*RHD* pos.), exceto *RHD* Ψ homocigóticos e hemizigóticos, respetivamente. Aqui, a reação é negativa, apesar de estar presente um alelo *RHD*.

Adicionalmente, o resultado com um *Rhesus Box* Downstream geneticamente modificado pode também ser um falso negativo, apesar de o espécime ser positivo D serologicamente. Assim, com um resultado serológico positivo D e positivo para PCR para o *Rhesus Box*, híbrido, o resultado é "Dd". É "DD" quando ocorre um resultado de PCR negativo para o *Rhesus Box* híbrido.

Devido a um polimorfismo distinto no *Rhesus Box* híbrido de africanos, pode ocorrer um resultado falso positivo na presença de alelos *RHD* Ψ e de outros alelos *RHD*.

No caso de um *Rhesus Box* híbrido em falta na população negra, os resultados para os alelos *RHD* Ψ e *Cde* obtidos por **RH-TYPE** têm de ser considerados. Outros alelos *RHD* negativos de antígeno D não podem ser excluídos com os kits de teste atualmente disponíveis. Isto tem de ser considerado na interpretação dos resultados. No entanto, a incidência destes alelos na população branca é bastante baixa.

O ADN degradado pode levar a resultados falsos negativos. Isto é mostrado pela presença única das bandas internas de controlo ou pela ausência total de bandas.

5. Avisos e precauções

O brometo de etídio é um mutagénio poderoso. Evite o contacto com a pele e contaminações. Consulte as instruções de utilização e os avisos e precauções do fabricante. O transiluminador irradia uma luz UV de onda muito curta que pode causar queimaduras na pele e na retina. Use uma máscara facial de proteção contra UV!

O material biológico usado para a extração de ADN, p. ex., sangue ou tecido humano, deve ser manuseado como sendo potencialmente infeccioso. Quando manusear material biológico, recomenda-se tomar precauções de segurança apropriadas (não pipetar com a boca, usar luvas descartáveis quando manusear material biológico e desempenhar o teste, desinfetar as mãos quando tiver acabado o teste). O material biológico deve ser desativado antes de ser eliminado (p. ex., por autoclave). Os descartáveis devem ser submetidos a autoclave ou incinerados após a utilização.

O derrame de material potencialmente infeccioso deve ser imediatamente removido com papel absorvente e as áreas contaminadas limpas com um desinfetante padrão adequado ou com uma solução de 70% de álcool. O material usado para limpar derrames, incluindo luvas, deve ser inativado antes de ser eliminado (p. ex., por autoclave).

A eliminação de todas as amostras, reagentes não usados e resíduos deve ser feita de acordo com as regulamentações nacionais, federais, estatais e locais.

A ficha de segurança (MSDS) está disponível para download em;
www.bag-healthcare.com.

6. Resolução de problemas

Problema	Possível motivo	Solução
Sem amplificação, Padrão de comprimento visível	ADN contaminado com inibidores de PCR, ADN degradado.	Repetir isolamento de ADN, tente métodos diferentes
	Concentração de ADN demasiado alta/baixa	Alterar a concentração de ADN repetir o isolamento de ADN
	A enzima está em falta ou a concentração é demasiado baixa	Repetir a tipificação, alterar a concentração de enzimas
	ADN de sangue heparinizado	Repetir tipificação com sangue EDTA
	Parâmetros de amplificação errados	Otimizar os parâmetros de amplificação (consultar 4.3) ☆
Falha repetitiva em faixas únicas (sem controlo de amplificação)	Fuga nos tubos de reação, perda de água e alteração da concentração durante a PCR	Apertar bem os tubos com as tampas
Amplificação não específica, bandas adicionais (as bandas adicionais do tamanho errado têm de ser ignoradas)	Contaminação com outros produtos de amplificação	Descontaminação, repetir tipificação, assegurar condições de trabalho limpas
	ADN contaminado com sais	Repetir isolamento de ADN, tentar métodos diferentes
	Concentração de ADN demasiado alta	Usar menos ADN
	Concentração de enzimas demasiado alta	Usar menos enzimas
	Parâmetros de amplificação errados	Otimizar os parâmetros de amplificação (consultar 4.3) ☆
A avaliação mostra mais de 2 especificidades	Transferência da contaminação (produtos de amplificação!) novo alelo	Verificar misturas de tipificação sem adicionar ADN, descontaminação, assegurar condições de trabalho limpas
Nenhuma banda visível, ou apenas bandas muito fracas visíveis, comprimento padrão invisível	Tingimento EtBr muito fraco	Repetir tingimento
Fundo de gel demasiado brilhante	Tingimento EtBr demasiado longo, concentração de EtBr demasiado alta	Embeber gel em H ₂ O ou TBE, concentração de EtBr mais baixa
Banda turva	Tampão de eletroforese demasiado quente ou gasto, tampão de eletroforese errado, a polimerização do gel não foi concluída	Baixar a tensão, usar tampão 0,5x TBE, usar gel totalmente polimerizado





☆ Quando usar o equipamento e os materiais listados, a otimização dos parâmetros de amplificação deve ser verificada em última instância. Na maioria dos casos, é possível avaliar o teste eliminando as bandas adicionais devido à variação de tamanho.

7. Referências

Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory

Para mais referências, consulte www.baq-healthcare.com.

8. Explicação dos símbolos usados nos rótulos

	Prazo de validade
	Temperatura de armazenamento
	Consulte as instruções de utilização
	Suficiente para "n" ensaios
BLOOD TYPING	Utilização prevista: Tipificação do grupo sanguíneo
CONT	Conteúdo, contém
HNA TYPING	Utilização prevista: Determinação de especificidades do HNA
HPA TYPING	Utilização prevista: Determinação de especificidades do HPA
IFU	Instruções de utilização
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
LOT	Código do lote
PCRBUF 10x	Tampão de PCR, concentração de 10x
PCRCAP	Tampas de PCR
PCRPLATE	Placas de PCR
PCRSTRIP	Tiras de PCR
REACTIONMIX	Misturas de reação
REF	Referência de catálogo
RTU	Pronto a usar
TAQ POLYMERASE	Taq polimerase
WORKSHEET	Ficha de trabalho

Para mais informação, visite o nosso website www.bag-healthcare.com
ou contacte-nos em info@bag-healthcare.com

Para instruções de utilização noutros idiomas, consulte:
<http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/>
ou ligue para: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49(0)6404/925-0
Fax: +49(0)6404/925-250

www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Encomenda:
Tel.: +49(0)6404/925-450
Fax: +49(0)6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Assistência ao cliente:
Tel.: +49(0)6404/925-125
Fax: +49(0)6404/925-421
service@bag-healthcare.com