

Instruções de utilização

HISTO TYPE SSP Kits

Instruções de utilização electrónica ver www.bag-healthcare.com

CE 0123

IVD

Kits de teste para a tipificação de tecido de alelos HLA numa base genética molecular
(Classe I: HLA-A, B, C e Classe II: HLA-DR, DQ)

pronto a usar, pré-aliquotado

REF 70721	HISTO TYPE A low
REF 70731	HISTO TYPE B low
REF 70741	HISTO TYPE C low
REF 70751	HISTO TYPE DR low
REF 70891	HISTO TYPE DQB low
REF 7098	HISTO TYPE ABDR
REF 7102	HISTO TYPE ABC
REF 7103	HISTO TYPE DR/DQB
REF 709010	HISTO TYPE DQB high
REF 7070	HISTO TYPE B27 low
REF 7071	HISTO TYPE B27 low
REF 70941	HISTO TYPE Celiac Disease
REF 70715	HISTO TYPE B*57:01 / B*51
REF 70716	HISTO TYPE Narcolepsy

Índice

1. Descrição do produto.....	2
1.1 Breve contexto HISTO TYPE Celiac Disease	2
1.2 Breve contexto HISTO TYPE B*57:01/B*51.....	2
1.3 Breve contexto HISTO TYPE Narcolepsy	2
1.4 Breve contexto HISTO TYPE B27.....	3
2. Material	3
2.1 Conteúdos dos HISTO TYPE SSP kits	3
2.2 Requisitos e material complementar	4
2.3 Armazenamento e estabilidade	4
3. Dados de desempenho	5
4. Procedimento de teste.....	5
4.1 Condições de segurança e notas especiais.....	5
4.2 Isolamento de DNA	5
4.3 Amplificação	5
4.4 Eletroforese em gel	8
4.5 Documentação e interpretação	8
5. Avisos e precauções	9
6. Resolução de problemas.....	10
7. Referências	10
8. Explicação dos símbolos usados nos rótulos.....	11

Versão: 17/2017 / Emissão: 2017-07 Alterações para a versão 16/2017 são realçadas em amarelo!

1. Descrição do produto

Os Kits **HISTO TYPE** são utilizados para tipagem de HLA com base em genética molecular.

Para obter mais informação sobre kits de teste para tipagem de alelos de HLA associados a doenças, consulte os capítulos 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4.

O material básico para a tipificação com **HISTO TYPE SSP kits** é DNA purificado. O procedimento de teste é feito usando os Sequence Specific Primers (SSP) -PCR (ver Fig. 1) [2, 3]. Este método baseia-se no facto de a extensão do iniciador e consequente PCR bem-sucedida dependerem de uma correspondência exata da extremidade 3' de ambos os iniciadores. Por conseguinte, apenas se os iniciadores corresponderem totalmente à sequência alvo é que é obtida uma amplificação que é subsequentemente visualizada por eletroforese em gel de agarose.

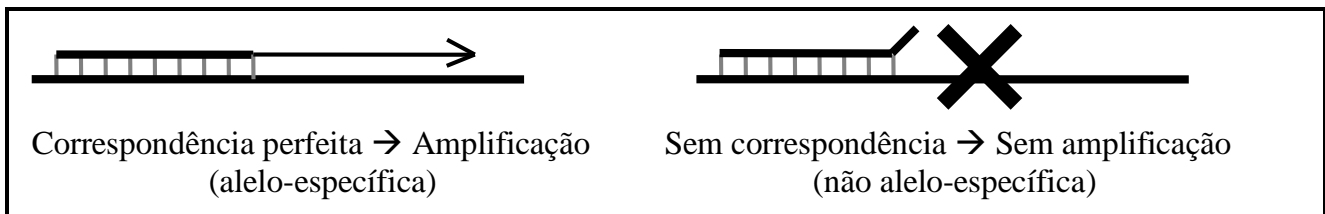


Fig. 1: Princípio de SSP-PCR

A composição das misturas do iniciador individual torna clara a identificação dos tipos HLA indicados nos respetivos diagramas de avaliação possíveis. Com cada tipificação, é usado um determinado número de misturas de reação **pré-aliquotadas** e **secas** incluindo controlo de amplificação interna com um volume final de 10 µl.

1.1 Breve contexto HISTO TYPE Celiac Disease

A doença celíaca é uma reação autoimune causada pelo glúten, que é um ingrediente encontrado em vários cereais. Se não for diagnosticada cedo, leva a uma inflamação crónica e à destruição do intestino delgado. A doença celíaca está fortemente associada ao haplotipo DQA1*05:01-DQB1*02:01 e DQA1*03-DQB1*03:02. Adicionalmente, podem ser usados alelos DR3, DR7 e DR11 como marcadores genéticos. [8-10]

1.2 Breve contexto HISTO TYPE B*57:01/B*51

É permitido um tratamento com medicamentos antirretrovirais (p. ex., para terapêutica do VIH) apenas quando contiver a substância ativa Abacavir, se o alelo HLA B*57:01 for excluído do doente. Isto deve-se a uma potencial reação de hipersensibilidade associada a este alelo. [11-13]

A doença de Behçet é uma vasculite crónica, caracterizada por úlceras orais recorrentes, úlceras genitais, envolvimento ocular e cutâneo e outras características multi-sistémicas. Embora esteja distribuída mundialmente, a doença de Behçet fixa-se numa área que vai desde a Ásia oriental à Bacia do Mediterrâneo. O HLA B*51 é um forte fator de risco para a doença e pode ser usado como ferramenta de diagnóstico. [14]

1.3 Breve contexto HISTO TYPE Narcolepsy

A narcolepsia é uma perturbação do sono com sintomas como sonolência excessiva durante o dia, paralisia do sono ou alucinações. 98% dos doentes de narcolepsia caucasianos têm um haplotipo DRB1*15:01 – DQA1*01:02 – DQB1*06:02. Por conseguinte, a tipificação de HLA é útil para confirmar ou excluir um diagnóstico. [15-17]

1.4 Breve contexto HISTO TYPE B27

A associação entre HLA-B27 e o grupo de doenças resumidas como artrite seronegativa (doença de Bechterew, doença de Reiter, artrite reativa) é tipicamente usada como parte do procedimento de diagnóstico. Um resultado positivo no HLA-B27 está associado a um risco muito alto de doença (ver tabela 1) [18,19]. Mais importante, um resultado de diagnóstico HLA-B27 apresenta uma importante contribuição para a terapêutica do doente em casos menos claros de suspeita de doença de Bechterew.

Doença	Frequência de B27 em doentes	Risco relativo
Espondilose anquilosante (doença de Bechterew)	90,2%	91
Doença de Reiter	78,8%	37,6
Artrite reativa pós-infeção	70,2%	

Tabela 1: Frequências e riscos de HLA-B27

2. Material

2.1 Conteúdo dos HISTO TYPE SSP kits

- ◆ HISTO TYPE – placas/tiras para a tipificação de HLA. As misturas de reação pré-aliquotadas e secas consistem num conjunto de iniciadores específicos de alelos, iniciadores de controlo interno (específicos para o gene humano G3PDH) e nucleótidos. A primeira mistura de reação está marcada (consultar organização da mistura na página 7). Na maioria dos produtos HISTO TYPE o controlo de contaminação está integrado na primeira ou na última posição. Pode ser identificado por uma cor diferente (mistura azul). O número de lote está impresso em cada placa/tira.
- ◆ Controlo de contaminação das tiras de PCR (8) com iniciadores de controlo interno e iniciadores específicos à amplificação (não separados, se o controlo de contaminação estiver integrado na última posição da placa de teste e no kit HISTO TYPE B27 low kit).
- ◆ Tampão 10x de PCR
- ◆ Tampas de tiras ou folha de PCR
- ◆ CD de informações (contém instruções de utilização para HISTO TYPE e HISTO MATCH**, tabela de especificidade *, hit table*, folha de dados, lista de “iniciadores não testados”, ficheiro de lote de HISTO MATCH** e SCORE*, certificado de controlo de qualidade)

*não se destina ao HISTO TYPE B27 low/**não se destina ao HISTO TYPE B27 low e ao HISTO TYPE Narcolepsy

2.2 Requisitos e material complementar

- ◆ Happy Taq (REF 70976) (ou outra Taq Polimerase, validada com os HISTO TYPE Kits pelo utilizador).
A Happy Taq é fornecida gratuitamente quando encomendada conjuntamente com o Kit HISTO TYPE.
Não use uma Taq Polimerase de arranque a quente!
- ◆ **BAG EXTRA-GENE I Kit** (REF 7059) para a extração de DNA de sangue/linfócitos/leucócitos ou material para outros métodos de extração de DNA
- ◆ pipetas operadas por pistão (0,5-250 µl)
- ◆ pontas esterilizadas com filtro integrado
- ◆ Ciclador de DNA (lista de cicladores validados, consultar a página 7)

Dispositivos e material para eletroforese em gel

- ◆ DNA agarose
- ◆ Tampão 0,5 x TBE (45 mM de Tris base, 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)
- ◆ DNA com comprimento padrão (REF 7097)

Dispositivos de interpretação e documentação

- ◆ Fonte UV (220 - 310 nm)
- ◆ câmara (p. ex., sistema Polaroid) com rolos (Polaroid tipo 667) ou sistema de vídeo com papel térmico (p. ex., Typ KP65HM-CE)
- ◆ PC, software de avaliação HISTO MATCH (BAG Health Care) ou SCORE (versão completa)

2.3. Armazenamento e estabilidade

Os HISTO TYPE kits são entregues à temperatura ambiente. Após receber o Kit por favor armazene todos os reagentes a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ou $2...8^{\circ}\text{C}$ no escuro (evite a variação frequente da temperatura de armazenamento!). Armazene em equipamentos com monitorização de temperatura.

As Happy Taq serão entregues com gelo seco ou em embalagens de frio. Armazene todas as Happy Taq a $<-20^{\circ}\text{C}$ em equipamentos com monitorização de temperatura após a receção (evite a variação frequente de temperatura de armazenamento!). O prazo de validade é indicado no rótulo de cada reagente e também é válido para reagentes abertos. O prazo de validade indicado no rótulo exterior refere-se ao reagente com a estabilidade menor contido no kit.

3. Dados de desempenho

A composição da mistura do iniciador garante uma identificação fiável dos tipos HLA (com base nos mais recentes dados da sequência) indicados no hit table. Serão feitas atualizações com regularidade.

A precisão e capacidade de reprodução da especificidade de cada mistura de iniciador foram verificadas para cada lote com amostras de referência predeterminadas. Os alelos não reconhecidos estão indicados nos documentos de avaliação.

Foi feito um estudo de avaliação para todos os HISTO TYPE SSP kits com pelo menos 30 amostras de DNA. Não foram registadas discrepâncias nos resultados obtidos em testes anteriores feitos com outros métodos ou nos SSP kits de outros fornecedores.

A avaliação e controlo de qualidade das misturas são feitos com amostras de ADN, extraídas pelo EXTRA GENE I (método de salgação) ou Qiagen kits (método baseado em colunas). Os HISTO TYPE kits são validados com o Happy Taq (REF 70976). Ao usar outra Taq Polimerase, a enzima deve ser validada com os HISTO TYPE kits pelo utilizador.

Pode ser garantida uma tipificação fiável se forem usados 25 - 50 ng de DNA 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 histocompatibilidade. As orientações de transplante, assim como as normas EFI devem ser seguidas de forma a minimizar o risco de tipificações falsas, particularmente no caso de discrepâncias entre os métodos serológicos e de genética molecular.

Respeite as condições 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 pré-amplificação (isolamento de DNA e preparação das reações) e pós-amplificação (eletroforese em gel, documentação). De preferência, use duas divisões separadas.
- ◆ Use dispositivos e outros materiais apenas nos locais respetivos e não os troque.

4.2 Isolamento de DNA

O kit **BAG EXTRA-GENE I** é o mais adequado para o isolamento do DNA, pois o DNA puro pode ser obtido sem a utilização de solventes ou químicos tóxicos. Adicionalmente, os métodos comerciais baseados em colunas ou contas ou outros métodos descritos na literatura são adequados para providenciar um DNA de pureza suficiente. A presença de heparina inibe potencialmente a PCR [6]. Por conseguinte, recomenda-se EDTA ou citrato de sangue para a tipificação.

O DNA deve ter os seguintes índices de pureza:

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

4.3 Amplificação

Todas as misturas de reação pré-aliquotadas e secas já contêm alelos e iniciadores de controlo específico e nucleótidos. Estas são fornecidas secas nos frascos de reação. Os parâmetros de amplificação são otimizados para um volume final de 10 µl.

1. Retire o número requerido de placas ou tiras HISTO TYPE HLA-SSP e o tampão 10 x de PCR do kit.
2. Pipete a mistura principal, que consiste num tampão 10x de PCR, solução de DNA, Taq Polimerase e água destilada e misture bem. Os diferentes HISTO TYPE SSP Kits funcionam com a mesma mistura principal e podem consequentemente ser combinados. A composição da mistura principal dependente do número de misturas de reação é indicada na tabela 1 (ver abaixo).

No caso do **HISTO TYPE B27**, recomenda-se uma **solução Taq-tampão-H₂O**:

0,08 µl	Taq polimerase (5 U/µl)	x n.º de determinações + 1
1,0 µl	tampão 10x de PCR	x n.º de determinações + 1
7,0 µl	H ₂ O	x n.º de determinações + 1

Misture bem a solução e adicione **8,0 µl** da mesma a cada recipiente de reação.

Depois, adicione **2,0 µl de solução de DNA** (12,5-25 ng/µl) no respetivo frasco de reação.

Se for necessário efetuar um **controlo de contaminação**, produza a mistura principal sem a solução de DNA primeiro e pipete 10 µl desta mistura no controlo de contaminação (de cor azul). Depois, adicione a solução de DNA à restante mistura principal e misture bem.

Tabela 1:

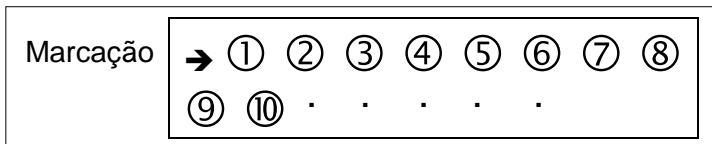
Composição da mistura principal dependendo do número de misturas de reação

n.º de misturas	Água destilada	Tampão 10x de PCR	Solução de DNA (25-50 ng/µl)	Happy-Taq (5 U/µl)	Volume Inteiro	
1	8	1	1	0,08	10	µl
4	63	8	8	0,6	80	µl
8	79	10	10	0,8	100	µl
24	222	28	28	2,2	280	µl
30	269	34	34	2,7	340	µl
32	285	36	36	2,9	360	µl
48	412	52	52	4,2	520	µl
54	459	58	58	4,6	580	µl
56	475	60	60	4,8	600	µl
72	618	78	78	6,2	780	µl
80	681	86	86	6,9	860	µl
96	808	102	102	8,2	1020	µl

⇒ A quantidade de DNA deve ser de 25 – 50 ng por mistura. Dependendo da concentração de DNA, a quantidade de DNA e água pode ter de ser ajustada (p. ex., para 24 misturas: 14 µl de solução de DNA (100 ng/µl) e 236 µl de água dest.).

⇒ Ao usar outra Taq Polimerase, a enzima tem de ser validada com os HISTO TYPE kits pelo utilizador.

- 3.: Depois da depuração centrífuga, adicione **10 µl** desta mistura imediatamente às misturas de reação pré-preparadas e secas. Mude a ponta após cada passo de pipetagem. Feche bem os tubos com as respetivas tampas ou película de alumínio. Assegure que não toca na parte interior das tampas e 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/tira para baixo para dissolver os grânulos no fundo da placa. Toda a solução de PCR deve fixar-se no fundo. Se necessário, a placa/tira deve ser girada para baixo.



Nota para HISTO TYPE B*57:01/B*51

Se apenas pretender detetar o B*57:01 ou o B*51, adicione a mistura principal apenas às misturas de reação correspondentes (para as especificidades das misturas de reação consulte a tabela no CD de informações).

- 4.: Coloque os tubos de reação no termociclador e aperte bem a tampa. Inicie o programa de PCR. A sobreposição das misturas de reação com óleo mineral **não** é necessária se for usada uma tampa aquecida e ajustada!

Parâmetros de amplificação

Programa-passo	Temp.	Tempo	N.º de ciclos
Primeira desnaturação	96 °C	5 min.	1 ciclo
Desnaturação	96 °C	20 seg.	5 ciclos
Hibridização+Extensão	68 °C	1 min.	
Desnaturação	96 °C	20 seg.	10 ciclos
Hibridização	64 °C	50 seg.	
Extensão	72 °C	45 seg.	
Desnaturação	96 °C	20 seg.	15 ciclos
Hibridização	61 °C	50 seg.	
Extensão	72 °C	45 seg.	
Extensão final	72 °C	5 min.	1 ciclo

Tipos de cicladores validados:

PTC 100 / 200 / C1000
(MJ Research/ BioRad),
GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (use taxa de aquecimento de 9600), Veriti (ABI)
Mastercycler epGradient S (use a função “simular gradiente Mastercycler”) (Eppendorf),
Tprofessional (Biometra)

Não use um bloco de aquecimento de alumínio (p. ex., GeneAmp PCR-System 9600 / 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. Se forem usados outros modelos que não os cicladores validados mencionados acima, estes têm de ser validados pelo utilizador.

Para otimizar a sua máquina, use o seguinte guia:

Se forem registadas reações **falso-positivas** (bandas não específicas, determinações adicionais), aumente a temperatura de hibridização em passos de 1 °C.

Se forem registadas reações **falso-negativas** (bandas em falta), diminua a temperatura de hibridização em passos de 1 °C e/ou aumente o tempo de hibridização em passos de 5 segundos e/ou aumente os tempos de desnaturação em passos de 5 segundos.

Recomenda-se a utilização exclusiva de cicladores que sejam calibrados com regularidade. Para isto, o CYCLER CHECK kit é bastante apropriado (REF 7104, 71044).

Os testes de controlo de qualidade foram feitos em PTC-200 resp. C1000 (MJ Research / BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) e Tprofessional (Biometra).

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, recomenda-se tampão 0,5 x 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 ranhura do gel. Adicionalmente, aplique 10 µl do DNA de comprimento padrão para a comparação de tamanhos. A separação da eletroforese é feita a 10-12 V/cm (com 20 cm de distância entre os elétrodos, aprox. 200-240 V), durante 20-40 min.. Após o funcionamento ter sido concluído, todo o gel é tingido numa solução de brometo de etídio (EtBr) (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr em H₂O ou tampão TBE) durante 30 - 40 min. 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 molhando o gel em H₂O ou tampão 0,5x TBE durante 20-30 min.

4.5 Documentação e interpretação

Para documentação, visualize a amplificação de PCR usando um transiluminador UV (220 - 310 nm) e fotografe-a com uma máquina, rolo e filtros adequados (p. ex., Polaroid, rolo tipo 667 ou sistema de vídeo, papel térmico KP65HM-CE). Escolha o tempo de exposição e a abertura de forma a que as bandas sejam esticadas ao máximo e se destaquem contra o fundo preto.

Para interpretação, use a tabela de especificidade e o hit table (ver Information-CD); apenas as bandas que têm a dimensão correta comparadas com o DNA de comprimento padrão devem ser consideradas como positivas.

Com o HISTO TYPE B27, as bandas específicas têm um comprimento de 420 bp e/ou 85 bp.

No caso de outros produtos HISTO TYPE, os tamanhos corretos são indicados no diagrama da tabela correspondente. Em todas as faixas sem amplificação alelo-específica, o controlo interno a **1070 bp (no HISTO TYPE Celiac Disease 1070 bp / 429 bp)** deve estar claramente visível. Na maioria dos casos em que há uma amplificação alelo-específica, o controlo interno é mais fraco ou desaparece completamente!

Se nem a banda específica nem a banda de controlo interno estiverem visíveis, o resultado da mistura não pode ser usado para avaliação. Há várias razões possíveis para a obtenção deste resultado, por favor consulte o quadro (6) para a resolução de problemas.

Nenhuma banda deve estar visível no **controlo de contaminação**. Se houver uma contaminação com DNA genómico, haverá uma banda a 282 bp. Podem ocorrer bandas adicionais a 78 bp, 104 bp, 176 bp e à volta de 580 bp. Se houver uma contaminação que amplifica, as bandas ocorrerão a 78 bp e/ou 104 bp e/ou 176 bp e/ou 282 bp e/ou 580 bp.

Para a avaliação, o software HISTO MATCH (fornecido gratuitamente pela BAG Health Care) ou SCORE (versão completa) tem de ser usado (exceto para o HISTO TYPE B27 low e HISTO TYPE Narcolepsy). Ficheiros de lote para a avaliação com HISTO MATCH e SCORE – ver CD de informações. Os ficheiros estão também disponíveis através do servidor de transferência (<http://service.bag-healthcare.com>) ou através do nosso serviço de atendimento ao cliente (telefone: +49 (0) 6404-925-125).

5. Avisos e precauções

O brometo de etídio é um mutagénio poderoso. Use luvas quando manusear géis ou soluções que contenham EtBr! Respeite 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 segurança contra UV!

Todo o material biológico usado para a extração de DNA, 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 autoclavados 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 autoclavagem).

A eliminação de todas as amostras, reagentes não utilizados e desperdício deve ser feita de acordo com as regulamentações do país, 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	DNA contaminado com inibidores de PCR	Repetir isolamento de DNA, tente métodos diferentes
	Concentração de DNA demasiado alta/baixa	Alterar concentração de DNA, repetir isolamento de DNA
	A enzima está em falta ou a concentração é demasiado baixa	Repetir tipificação, alterar a concentração de enzimas
	DNA de sangue heparinizado	Repetir tipificação com EDTA ou citrato de sangue
	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	Fechar tubos com as tampas
Amplificação não específica, bandas adicionais, (as bandas adicionais do tamanho errado têm de ser ignoradas)	Contaminação com produtos de amplificação	Repetir tipificação, assegurar funcionamento exato
	DNA contaminado com sais	Repetir isolamento de DNA, tente métodos diferentes
	Concentração de DNA demasiado alta	Usar menos DNA
	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 acrescento de DNA) assegurar funcionamento exato
Nenhuma banda visível, ou apenas bandas muito fracas visíveis, comprimento padrão invisível	Tingimento muito fraco	Repetir tingimento
O fundo do gel tem demasiado brilho	Tingimento demasiado longo, Concentração da solução de tingimento demasiado alta	Embeber o gel em H ₂ O ou TBE Concentração da solução de tingimento mais baixa
Banda turva	Tampão de eletroforese demasiado quente ou gasto, tampão de eletroforese errado, a polimerização do gel não foi bem feita	Baixar a tensão usar tampão 0,5 x TBE usar gel completamente 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 causadas por discrepâncias no tamanho.

7. Referências

1. Bodmer, J., 1993. Immunogenetics **37**:79-94
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
5. Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166
7. Bunce, M., 1995. Tissue Antigens **46**:355-367
8. Sacchetti et al., 1997. Clin Chem **43**:2204-2206
9. Edwin Liu et al., 2005. Gastroenterology **128**:33.37
10. Husby et al., 2012. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition **54**:136-160
11. Deutsches Ärzteblatt vom 10.03.2008
12. Mallal et al., Lancet 2002; 359: 727-732
13. Mallal et al., New England Journal of Medicine 2008; 358: 568-579
14. Menthon et al., Arthritis & Rheumatism 2009; 61:1287-1296; DOI 10. 1002/art.24642
15. Nishino, S. et al., 2000. Sleep Medicine Reviews **4**:75-99
16. Mignot, E. et al., 2001. Am. J. Hum. Genet. **68**:686-699
17. Overeem, S. et al. 2008. Sleep Medicine Reviews **12**:95-107
18. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet **i**:904-907
19. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. **288**:704-706

8. Explicação dos símbolos usados nos rótulos

	Temperatura de armazenamento / Limites de temperatura
	Temperatura de armazenamento / Limite inferior de temperatura
	Prazo de validade
	Consulte as instruções de utilização
	Atenção
	Suficiente para "n" ensaios
	Fabricante
CONT	Conteúdo, contém
CONTROL CC	Controlo de contaminação
HLA TYPING	Utilização prevista: tipificação de HLA
HISTO TYPE INFORMATION CD	CD (contém instruções de utilização, ficheiros para avaliação, certificado de controlo de qualidade)
eIFU	Instruções de utilização electrónica
IVD	Para utilização em diagnóstico in vitro
LOT	Código do lote
OR	ou
PCRBUF 10x	Tampão de PCR, concentração de 10x
PCRCAP	Tampas de PCR
PCRFOIL	Película de alumínio de PCR
PCRPLATE	Placas de PCR
PCRSTRIP	Tiras de PCR
REACTIONMIX	Misturas de reação
REF	Referência de catálogo
RTU	Pronto a usar
TAQ POLYMERASE	Polimerase Taq
WORKSHEET	Ficha de trabalho

Para instruções de utilização noutros idiomas, consulte:

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

ou ligue para: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Alemanha

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