

ES

Instrucciones de Uso

“Kits” BAGene SSP



“Kits” de Pruebas para la determinación de los grupos sanguíneos ABO blood, tipos RH, sistemas Kell, Kidd y Duffy, sistema MNS, especificidades HPA y HNA basado en genética molecular

listo para usar, prealicutado

- 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 Zygotity-TYPE**
- REF 6650: KKD-TYPE**
- REF 6652: MNS-TYPE**
- REF 6660: HPA-TYPE**
- REF 66701: HNA-TYPE**

Contenidos

- 1. Descripción del Producto 2
- 2. Material 2
 - 2.1 Contenidos de los “kits” BAGene 2
 - 2.2 Material requerido no incluido en el “kit” 2
 - 2.3 Almacenamiento y estabilidad 3
- 3. Datos de funcionamiento 3
- 4. Procedimiento de la Prueba 3
 - 4.1 Condiciones de Seguridad y Observaciones especiales 3
 - 4.2 Extracción de ADN 3
 - 4.3 Amplificación 4
 - 4.4 Electroforesis en Gel 6
 - 4.5 Fotodocumentation 6
 - 4.6 Interpretación de los resultados y limitaciones del método 6
 - 4.6.1 General 6
 - 4.6.2 “Kits” ABO-TYPE y ABO-TYPE variant 6
 - 4.6.3 “Kit” RH-TYPE 7
 - 4.6.4 “Kit” Partial D-TYPE 8
 - 4.6.5 “Kit” D Zygotity TYPE 8
- 5. Avisos y Precauciones 8
- 6. Solución de Problemas 9
- 7. Bibliografía 9
- 8. Explicación de los símbolos usados en el Etiquetado 10

Versión: 9/2014 / Distribución: 2014-07

1. Product description

Los “kit” BAGene se usan para el genotipado de las especificidades ABO, RH, Kell, Kidd, Duffy, MNS, HPA y HNA. Sirven para completar, aclarar y confirmar los resultados serológicos y posibilitan un claro tipado de los donantes, los receptores y mujeres embarazadas a nivel de ADN.

El material básico para el tipaje con los “kits” **BAGene** es ADN purificado de leucocitos. La detección se realiza aplicando la metodología PCR-SSP, con “primers” específicos de secuencia (ver Figura. 1). Este método está basado en el hecho que la extensión del “primer” y por tanto la PCR exitosa depende de un ajuste perfecto en los extremos 3' de ambos “primers”. Por tanto, sólo si los “primers” ajustan completamente con la secuencia diana se obtendrá amplificación la cual se visualizará posteriormente usando electroforesis en gel de agarosa.

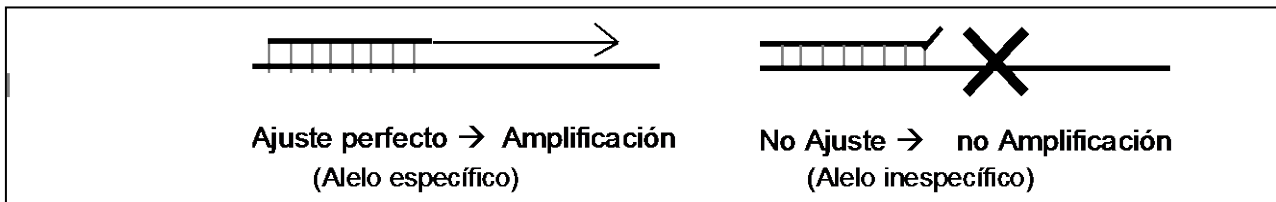


Figura 1: Principio de una PCR-SSP

La composición de las mezclas de primers individuales permite la identificación clara de los genotipos ABO, RH, KEL, JK, FY, MNSs, HPA y HNA indicados en las respectivas hojas de trabajo. Se usa un cierto número de mezclas de reacción prealiquotadas por tipaje. Cada mezcla de reacción incluye un control interno de amplificación.

2. Material

2.1 Contenidos de los “kits” BAGene

- ◆ Placas/tiras de PCR plates/strips para el genotipado de grupos sanguíneos. Las mezclas prealiquotadas y secas están formadas por “primers” específicos de alelo, “primers” para el control interno (específicos para el gen de HCH (Hormona de Crecimiento Humana) o para una secuencia del cromosoma I (90 kbp 5' de la Caja Rhesus)) y nucleótidos. La mezcla de reacción N° 1 está marcada. El número de lote está impreso en cada placa.
- ◆ Tampón de PCR 10x
- ◆ Tiras de tapones de PCR (de 8).
- ◆ Instrucciones de uso, hoja de trabajo
- ◆ Información para evaluación (sólo “kit” ABO-TYPE variant)

2.2 Material requerido no incluido en el “kit”

- ◆ Taq Polimerasa (5 U/μl), (p.ej.: HISTO TAQ, [REF](#) 70975 o Taq de Qiagen).
!!! No usar una Taq Polimerasa “Hot-start” !!!
- ◆ “Kit” **BAG EXTRA-GENE I** ([REF](#) 7059), opcional, para la extracción de ADN de sangre, linfocitos, leucocitos o material para otros métodos de extracción de ADN
- ◆ Pipetas automáticas (0,5-250 μl)
- ◆ Puntas estériles con filtro integrado
- ◆ Termociclador para ADN (listado de los termocicladores validados en la página 5)
- ◆ Agarosa para ADN
- ◆ 0,5x tampón TBE (45 mM de Tris base, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA)
- ◆ Bromuro de Etidio (EtBr)
- ◆ Unidad de electroforesis
- ◆ Fuente de Alimentación (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ Estándar de longitudes de ADN (DNA-length standard [REF](#) 7097)
- ◆ Fuente UV (220 - 310 nm)
- ◆ Sistema de Fotodocumentación de Geles

2.3. Almacenamiento y estabilidad

Los “kits” se entregan a temperatura ambiente. Almacenar todos los reactivos a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta de cada reactivo y es válida también para reactivos una vez abiertos. La fecha de caducidad indicada en la etiqueta exterior hace referencia al reactivo con la estabilidad más corta contenido en el “kit”. Descongelar el Tampón de PCR 10x poco antes de ser usado.

3. Datos de funcionamiento

La composición de la mezcla de “primers” garantiza una identificación fiable de los alelos indicados en la hoja de trabajo, basados en los datos de secuencia conocidos actualmente.

La precisión y reproducibilidad de la especificidad de cada mezcla de “primers” para cada lote fue verificada con ADN de muestras control, con especificidades conocidas. Los alelos, que no están incluidos y debido a su rareza no se han probado respectivamente, están indicados en las hojas de trabajo (nt = No testado actualmente).

Se realizó un estudio de funcionamiento de los “kits” BAGene con muestras de ADN previamente tipadas. Las investigaciones mostraron una clara concordancia con los tipajes serológicos y/o genéticos previos. No se encontraron discrepancias durante los estudios.

La evaluación y el control de calidad de las mezclas se realiza con muestras de ADN, que se extraen con EXTRA GENE I (método salino) o “kits” Qiagen (método basado en columnas).

Los “kits” BAGene están validados con HISTO TAQ (REF 70975) y Taq Polimerasa de Qiagen.

Se garantiza un tipado fiable usando de 50 - 100 ng de ADN por mezcla de reacción. El “kit” D Zygosity-TYPE representa una excepción. Debido a la mayor duración del programa de PCR, para este producto se debe usar una concentración menor de ADN, 30 - 50 ng por mezcla de reacción.

4. Procedimiento de la Prueba

4.1 Condiciones de Seguridad y Observaciones especiales

La PCR es un método particularmente sensible y deben ser realizadas por personal capacitado, con experiencia en técnicas de genética molecular y pruebas de grupos sanguíneos. Se deben observar las pautas actualizadas en medicina de transfusiones, determinación de grupos sanguíneos y anamnesis de transfusiones para reducir el riesgo de tipajes falsos, especialmente cuando se obtienen resultados diferentes con los métodos serológicos y genéticos. El genotipado de las especificidades ABO, RHD/RHCE, Kell, Kidd, Duffy, MNS, HPA y HNA se tiene que realizar tras las pruebas serológicas.

Se deben tener condiciones especiales de seguridad para evitar contaminación y, por tanto, falsas reacciones:

- Use guantes durante el trabajo (sin polvo, si es posible).
- Utilizar puntas nuevas en cada paso de pipeteo (con filtro integrado).
- Utilizar áreas de trabajo diferentes para la preamplificación (purificación de ADN y preparación de las reacciones) y postamplificación (electroforesis en gel y documentación). Preferiblemente utilice dos habitaciones separadas.
- Utilizar los dispositivos y otros materiales sólo en los lugares respectivos y no intercambiarlos.

4.2 Extracción de ADN

El “kit” **EXTRA-GENE I** es el más adecuado para la extracción de ADN dado que se puede obtener ADN purificado de sangre total en poco tiempo sin usar químicos tóxicos o disolventes. Además métodos comerciales basados en columnas o partículas magnéticas u otros métodos descritos en la literatura son también adecuados para obtener ADN con suficiente pureza. La heparina potencialmente inhibe la PCR. Por lo que se recomienda el uso de sangre EDTA o Citrato para tipificación.

El ADN debería tener los siguientes índices de pureza:

- $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280} = >1.5$ y <2.0 (indicador de contaminación con ARN/proteínas)
- $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{230} = >1.8$ (indicador de contaminación con sales, carbohidratos o solventes orgánicos)

4.3 Amplificación

Todas las mezclas de reacción prealiquotadas ya contienen “primers” específicos de alelos y controles y nucleótidos. Estos se suministran secos en el fondo del tubo de reacción. Los parámetros de amplificación están optimizados para un volumen final de 10µl.

1. Coger de los “kits” el número de placas/tiras de ≤ -20°C y descongelar el tampón de PCR 10x.
2. Pipetear la Master-Mix formada por tampón de PCR 10x, solución de ADN, Taq-Polimerasa y H₂O destilada y mezclar bien. Los diferentes “kits” BAGene funcionan con la misma Master-Mix y por lo tanto se pueden combinar, excepto el “kit” D Zygotity-TYPE para el que se recomienda otra concentración de ADN. La composición de la Master-Mix se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición de la Master-Mix dependiendo del N° de mezclas de reacción:

| Nº de mezclas | Agua Dest. | Tampón de PCR 10x | Solución de ADN (50-100 ng/µl) ♠ | Taq Polimerasa (5 U/µl) | Volumen 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 concentraciones de ADN, las cantidades de ADN y agua se tienen que ajustar (p.ej.: para 12 mezclas: ADN (120 ng/µl): 5,8 µl ADN y 119µl de Agua destilada).

☆ Se recomienda una preparación mínima de 6 mezclas de reacción, debido al pequeño volumen de Taq-Polimerasa.

♠ Para el “kit” D Zygotity-TYPE se recomienda una concentración de ADN de 30 – 50 ng/µl.

3. Tras agitar en el vortex, añadir **10 µl** de esta mezcla inmediatamente a las mezclas precargadas y secas. Cambiar de punta tras cada paso de pipeteo. Cerrar los tubos fuerte con sus respectivos tapones o con una lámina adhesiva. Asegurarse de no tocar con los dedos la parte interior de los tapones o los bordes superiores de los tubos para evitar contaminaciones. Si se usan termocicladores con tapa de ajuste fuerte, también es posible usar alfombrillas de PCR reutilizables. Agitar ligeramente la placa para disolver el pellet del fondo del tubo. Toda la solución de PCR debe quedarse en el fondo. Si fuera necesario la placa debería ser centrifugada un instante

4. Colocar los tubos de reacción con firmeza en el termociclador y apretar bien la tapa para que los tubos no se deformen con el calor. Iniciar el programa de PCR. ¡¡**No** es necesario recubrir las mezclas de reacción con aceite mineral si se usa una tapa caliente y ajustada!!

| | | |
|------------|----------------|---|
| Marcando → | Nº Lote | |
| | ① | ⑨ |
| | ② | ⑩ |
| | ③ | . |
| | ④ | . |
| | ⑤ | . |
| | ⑥ | . |
| | ⑦ | . |
| ⑧ | . | |

Parámetros de Amplificación para todos los kits BAGene excepto D Zygosity-TYPE

| Programa-Paso | Tiempo | Temp. | Nº de Ciclos |
|------------------------|--------|-------|--------------|
| Desnat. Inicial | 5 Min | 96°C | 1 Ciclo |
| Desnaturalización | 10 Seg | 96°C | 5 Ciclos |
| Anillamiento+Extensión | 60 Seg | 70°C | |
| Desnaturalización | 10 Seg | 96°C | 10 Ciclos |
| Anillamiento | 50 Seg | 65°C | |
| Extensión | 45 Seg | 72°C | |
| Desnaturalización | 10 Seg | 96°C | 15 Ciclos |
| Anillamiento | 50 Seg | 61°C | |
| Extensión | 45 Seg | 72°C | |
| Extensión Final | 5 Min | 72°C | 1 Ciclo |

Termocicladores Validados:

PTC 200 / C1000
(MJ Research/ BioRad),

GeneAmp PCR-System
9700 (usar tasa de
calentamiento del 9600)
(ABI),

Mastercycler epGradient S
(usar la función "simular
gradiente de Mastercycler")
(Eppendorf)

Tprofessional (Biometra)

!!! ATENCIÓN: Programa de PCR diferente !!!

Parámetros de Amplificación para D Zygosity-TYPE

| Programa-Paso | Tiempo | Temp. | Nº de Ciclos |
|-------------------|--------|-------|--------------|
| Desnat. Inicial | 10 Min | 95°C | 1 Ciclo |
| Desnaturalización | 20 Seg | 92°C | 35 Ciclos |
| Anillamiento | 30 Seg | 64°C | |
| Extensión | 5 Min | 68°C | |
| Extensión Final | 5 Min | 72°C | 1 Ciclo |

Termocicladores Validados:

Ver los parámetros de
amplificación de los otros
"kits" BAGene

!! No usar bloques térmicos de aluminio (p.ej.: GeneAmp PCR-System 9700) !!

Cuando se usen termocicladores con tasas muy rápidas de calentamiento y enfriamiento, se recomienda usar una rampa térmica reducida (~ 2.5°C/seg).

Dado que los termocicladores de diferentes fabricantes rinden de manera distinta e incluso máquinas individuales de un tipo pueden estar calibradas diferentemente, puede ser necesario optimizar los parámetros de amplificación.

Para optimizar un termociclador usar la siguiente guía:

Si hay reacciones **falsas positivas** (bandas inespecíficas, tipos adicionales), aumentar la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C.

Si hay reacciones **falsas negativas** (bandas desaparecidas), disminuir la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C y/o aumentar los tiempos de anillamiento en pasos de 5 segundos y/o aumentar los tiempos de desnaturalización en pasos de 5 segundos

Se recomienda usar exclusivamente termocicladores calibrados con regularidad. El "kit" CYCLER CHECK (REF 7104) es muy adecuado para este fin.

4.4 Electroforesis en Gel

La separación de los productos de amplificación se realiza usando un gel (horizontal) de agarosa. Como tampón para la electroforesis, se recomienda TBE 0,5x (45 mM de tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA). La concentración del gel debe ser del 2,0 – 2,5% de agarosa. Dejar polimerizar el gel al menos 30 minutos antes de cargar las muestras.

Al terminar la amplificación, sacar las muestras del termociclador y cargar cuidadosamente todas las muestras de reacción completas en cada pocillo del gel. Además, aplicar 10µl de un estándar de longitud de ADN para comparar los tamaños. La separación electroforética se hace a 10 - 12 V/cm (con una distancia de unos 20 cm entre los electrodos, aprox. 200 - 240V), durante 20 - 40 minutos. Se recomiendan 40 minutos para mejorar la separación de las bandas al usar D Zygosity-TYPE. Tras finalizar, se tiñe el gel completo en una solución de Bromuro de Etidio (EtBr) (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr en H₂O o tampón TBE) durante 30 - 40 minutos. Como alternativa, el EtBr (0,5 µg/ml) se puede añadir al tampón de electroforesis o al gel de agarose. Si fuese necesario, se puede eliminar el exceso de EtBr empapando el gel en H₂O o en tampón TBE 0,5x durante 20 - 30 minutos.

4.5 Fotodocumentación

Para fotodocumentación, visualizar el amplificado de la PCR usando un transiluminador UV (220 - 310nm) y un sistema adecuado de fotodocumentación de geles. Elegir el tiempo de exposición y la apertura de tal manera que las bandas se vean nítidas y destaquen frente al fondo oscuro (apertura aproximada 11, tiempo de exposición 1 segundo). Los resultados se documentan en la hoja de trabajo suministrada (ver punto 4.6)

4.6 Interpretación de los resultados y limitaciones del método

4.6.1 General

Los resultados obtenidos con los “kits” BAGene son documentados en las hojas de trabajo suministradas. En las hojas de trabajo están listadas en una tabla todas las características, especificidades, fenotipos y genotipos, y un ejemplo de patrón de reacción sirve como apoyo a la interpretación. Las preparaciones de PCR tiene números de reacción (p.ej.: ABO-TYPE reacción nº 1 - 8). La longitud del fragmento de ADN se indica en **bp** bajo los números de reacción en la hoja de trabajo. Se muestran posibles patrones de bandas del gel en las líneas de abajo. Los productos específicos de PCR (reacciones positivas) se designan como “+” y los cuadros correspondientes del diagrama tienen un fondo coloreado. Los “kits” ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygosity-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, HPA-TYPE y HNA-TYPE están resaltados en **gris**, RH-TYPE additional en **rojo, verde y azul**. La evaluación de los patrones de reacción se lleva a cabo en las líneas de izquierda a derecha.

Sólo se deben considerar positivas las bandas que tengan el tamaño correcto en comparación con el estándar de longitud de ADN. Los tamaños correctos vienen en las hojas de trabajo. En todas las calles sin amplificación específica de alelo, se debe ver claramente una banda de **434bp** del control interno. Son excepciones **D Zygosity-TYPE** y la reacción de PCR con **nº2 de mezcla de RH-TYPE** que muestra un control interno de **659bp**. ¡En la mayoría de los casos con una amplificación específica de alelo la banda del control interno es más débil o incluso desaparece completamente! Para resultados inapropiados ver resolución de problemas (punto 6).

Si no se pudiera obtener un resultado claro con los “kits” BAGene (p.ej.: debido a alelos desconocidos que no se pueden detectar con los “primers” existentes), se deben seguir las normas nacionales de transfusión en concordancia con los tipajes serológicos. Se recomienda el análisis de esas muestras por secuenciación. Los resultados de tipaje se deben interpretar teniendo en cuenta la varianza genética de los diferentes grupos étnicos. En caso de duda, el fenotipo es válido.

4.6.2 “Kits” ABO-TYPE y ABO-TYPE variant

La expresión homocigota de los alelos *ABO*O01*, *ABO*O03*, *ABO*B101*, *ABO*A201* se indica por medio de las bandas en la correspondiente reacción de PCR (1, 3, 5, ó 7). En heterocigosis todas las cuatro “no-reacciones” tienen que tener una banda en el gel (2, 4, 6, y 8) además de dos

preparaciones específicas de PCR (1, 3, 5, 7). La homocigosis del alelo *ABO*A101* se indica sólo por bandas en todas las cuatro “no-reacciones” (2, 4, 6, 8), dado que no hay ninguna preparación específica para *ABO*A101*. La constelación de heterocigosis de *ABO*A101* se puede reconocer por una banda adicional de las reacciones específicas de alelo (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16).

Dado que sólo una selección de alelos de la *variante A* pueden ser detectados por el “kit” ABO-TYPE variant, otros alelos de la *variante A* pueden estar ocultos por el resultado de PCR ***ABO*A101***. Dado que sólo una selección de alelos de la *variante B* y ningún alelo de la *variante A²* pueden ser detectados por el “kit” ABO-TYPE variant, otros alelos de las *variantes B* o *A²* pueden estar ocultos por los resultados de PCR ***ABO*B101*** y ***ABO*A201*** respectivamente. La mayoría de los alelos *B^(A)* y *cis AB* también muestran un resultado positivo en la reacción *ABO*B101*.

Aparece una banda específica para la HCH con una longitud de 434 bp como control interno.

Se suministran explicaciones detalladas en una información adicional para la evaluación del “kit” ABO-TYPE variant adjuntas con cada “kit”. Consultar también las observaciones especiales en las hojas de trabajo de los “kits” ABO-TYPE y ABO-TYPE variant.



4.6.3 “Kit” RH-TYPE

La determinación molecular de *RHD* estándar así como de algunas variantes *RHD* (haplotipos *RHD* positivos en especímenes negativos para D serológicamente, D parcial) son realizados en reacciones designadas de PCR.



Las preparaciones 1 y 2 son reacciones de PCR Múltiple para examinar 5 polimorfismos de *RHD* (intrón 4 y 7 de *RHD*, exón 7, así como la detección específica de *RHD* (W16X) y *RHD Ψ*). Esto significa que, en contraste con todos los otros “kits” BAGene (excepto para la banda del control interno) no sólo uno, sino también pueden aparecer dos amplicones en una reacción de PCR. Para facilitar la evaluación, los cuadros respectivos están divididos cuando pueden aparecer dos bandas posibles y tienen un fondo bicolor. Las longitudes de los fragmentos de los productos de PCR y los polimorfismos están identificados también con un color específico según los cuadros del patrón de reacción.

Ejemplo *RHD Ψ* :

Preparación N° 1: Tienen que aparecer dos bandas específicas en el gel.

- Producto de PCR: 224 bp – identificación **verde**, patrón de reacción  en cuadro con fondo **verde**.
- Producto de PCR: 123 bp – identificación **azul**, patrón de reacción  en cuadro con fondo **azul**.

Preparación N° 2: Tienen que aparecer dos bandas específicas en el gel.

- Producto de PCR: 154 bp – identificación **rojo**, patrón de reacción  en cuadro con fondo **rojo**.
- Producto de PCR: 390 bp – identificación **verde**, patrón de reacción  en cuadro con fondo **verde**.

Las reacciones de PCR designadas se usan para la determinación genética molecular de las características del locus del gen *RHCE*. Aparece una banda con una longitud de 434bp, específica para la HCH como control interno. Excepción: la reacción de PCR n° 2 donde aparece una banda control de 659bp (secuencia genómica del cromosoma I, 90 kbp 5' de la *Caja Rhesus*).

Si el patrón de reacción indica una categoría D, se puede realizar un examen posterior usando el “kit” **Partial D-TYPE** para excluir mutaciones puntuales como una causa de estos resultados.

4.6.4 “Kit” Partial D-TYPE

Una banda perdida en la reacción nº 4 puede indicar DFR (serología: positivo débil con anti-D) o *RHD* Ψ (en serología D negativo, hemi- u homocigoto). Si falta la información serológica, la confirmación o exclusión de *RHD* Ψ se puede obtener usando el “kit” RH-TYPE. En presencia de los tipos D débiles 41 y 45 puede ocurrir una reacción perdida de la mezcla nº 9. Las mutaciones de secciones de intrón también pueden conducir a una reacción perdida en la mezcla nº 8 ó 9. En presencia del tipo D débil 20 la reacción nº 10 normalmente no muestra banda, pero a veces aparece una banda débil.

Actualmente no es posible la diferenciación genética molecular del *RHD* estándar de las variantes de D: **DCS**, **DFW**, **DIM**, **DNU**. La consideración de los haplotipos es útil.

4.6.5 “Kit” D Zygosity-TYPE

Para alelos *RHD*, que no pueden ser determinados serológicamente (RhD neg.), puede suceder una discrepancia entre los resultados de la prueba serológica y el genotipado. La detección positiva de la *Caja Rhesus* “Downstream” muestra la presencia de un alelo *RHD* (*RHD* pos.), excepto *RHD* Ψ homocigotos y hemizigotos respectivamente. La reacción aquí resultante es negativa aunque un alelo *RHD* esté presente.

Además, el resultado con una *Caja Rhesus* “Downstream” genéticamente modificada puede ser también falsa negativa, aunque el espécimen sea serológicamente D-positivo. Por tanto, con un resultado positivo para D serológicamente y PCR positiva para la *Caja Rhesus* Híbrida, el resultado es “Dd.” Es “DD” cuando es un resultado negativo de PCR para la *Caja Rhesus* Híbrida. Debido al polimorfismo característico de la *Caja Rhesus* Híbrida de los africanos, puede aparecer un resultado falso positivo en presencia de *RHD* Ψ y otro alelo *RHD*.

En el caso de una *Caja Rhesus* Híbrida perdida en la población negra, los resultados para los alelos *RHD* Ψ y *Cde*^s obtenidos usando **RH-TYPE** tiene que ser considerados. Otros alelos *RHD* con antígeno D negativo no se pueden excluir con los “kits” de pruebas disponibles actualmente. Esto debe ser considerado en la interpretación de los resultados. Sin embargo la incidencia de estos alelos en la población blanca es bastante baja.

El ADN degradado puede producir resultados falsos negativos. Esto se puede observar por la presencia única de las bandas del control interno o por la ausencia completa de bandas.

5. Avisos y Precauciones

El Bromuro de Etidio es una sustancia mutagénica potente. ¡Usar guantes cuando se manejen geles o soluciones que contengan EtBr! ¡Tenga en cuenta las instrucciones de uso, avisos y precauciones del fabricante! El transiluminador emite ondas muy cortas de luz UV que puede causar quemaduras en piel y retina. ¡Usar una máscara de seguridad!

El material biológico que se utiliza para la extracción de ADN, p. ej., sangre o tejidos humanos, se deben tratar como potencialmente infecciosos. Cuando se manipula material biológico se recomienda observar las debidas medidas de seguridad (no pipetear con la boca; usar guantes desechables durante la manipulación material biológico y la realización de la prueba; desinfectar las manos cuando haya terminado la prueba).

El material biológico se debe desactivar antes de desechar (por ejemplo en un autoclave). Los materiales desechables se deben esterilizar o incinerar después de utilizarlos.

Los derrames de materiales potencialmente infecciosos se deben eliminar inmediatamente con papel absorbente y limpiar las zonas contaminadas con un desinfectante estándar adecuado o de alcohol al 70%. Los materiales que se usan para limpiar derrames, incluyendo guantes, se deben desactivar antes de desecharlos (p. ej. en una autoclave).

El desecho de todas las muestras, reactivos no usados y residuos se debe realizar de acuerdo a las normas nacionales, autonómicas, provinciales y locales.

Las Hojas de Datos de Seguridad de Materiales (MSDS) se pueden descargar en el sitio Web: www.bag-healthcare.com

6. Solución de Problemas

| Problema | Posible causa | Solución |
|--|--|---|
| no amplificación, estándar de longitud visible | ADN contaminado con inhibidores de PCR | Repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos |
| | Concentración de ADN demasiado alta/demasiado baja | Cambiar concentración del ADN, repetir extracción de ADN |
| | No hay enzima o concentración demasiado baja | Repetir tipaje, cambiar concentración del ADN |
| | ADN de sangre heparinizada | Repetir tipaje, sangre EDTA o citrato |
| | Parámetros de amplificación incorrectos | optimizar los parametros de amplificación (ver 4.3) ☆ |
| fallo repetitivo en calles aisladas (no control de amplificación) | Agujero en los tubos de reacción; pérdida de agua y cambio de concentración durante la PCR | cerrar fuerte los tubos con los tapones |
| amplificación inespecífica, bandas adicionales, (bandas adicionales de tamaño incorrecto deben ser olvidadas) | contaminación con productos de amplificación | Repetir tipaje, asegurar funcionamiento exacto |
| | ADN contaminado con sales | Repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos |
| | Concentración de ADN demasiado alta | usar menos ADN |
| | Concentración de enzima demasiado alta | usar menos enzima |
| | Parámetros de amplificación incorrectos | optimizar los parametros de amplificación (ver 4.3) ☆ |
| La evaluación muestra más de 2 especificidades | Contaminación por arrastre (productos de amplificación!) Nuevo alelo | comprobar mezclas de tipado (ADN no añadido) asegurar funcionamiento exacto |
| Ninguna o sólo bandas débiles visibles, estándar de longitud invisible | tinción con EtBr demasiado débil | repetir teñido |
| el fondo del gel tiene demasiado brillo | la tinción fue duró demasiado, concentración de EtBr demasiado alta | sumergir el gel en H ₂ O o TBE disminuir la concentración de EtBr |
| bandas borrosas | tampón de electroforesis demasiado caliente o agotado, tampón de electroforesis incorrecto, mala polimerización del gel | disminuir el voltaje usar tampón TBE 0,5x |





☆ Cuando se usan equipamientos y materiales listados, la optimización de los parámetros de amplificación se debería buscar sólo como un último recurso. En la mayoría de los casos, es posible evaluar la prueba eliminando las bandas adicionales causadas por discrepancia en el tamaño.

7. Bibliografía

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

Para bibliografía adicional visitar www.bag-healthcare.com.

8. Explicación de los símbolos usados en el Etiquetado

| | |
|---|---|
|  | Usar antes de |
|  | Temperatura de almacenamiento |
|  | Consultar instrucciones de uso |
|  | Suficiente para "n" pruebas |
| BLOOD TYPING | Propósito de uso: Tipado de Sangre |
| CONT | Contenido, contiene |
| HNA TYPING | Propósito de uso: Determinación de especificidades HNA |
| HPA TYPING | Propósito de uso: Determinación de especificidades HPA |
| IFU | Instrucciones de uso |
| IVD | Para uso en Diagnóstico in Vitro |
| LOT | Código de Sublote |
| PCRBUF 10x | Tampón de PCR, concentrado 10x |
| PCRCAP | Tapones de PCR |
| PCRPLATE | Placas de PCR |
| PCRSTRIP | Tiras de PCR |
| REACTIONMIX | Mezclas de Reacción |
| REF | Referencia |
| RTU | Listo para usar |
| WORKSHEET | Hoja de Trabajo |

Para más información visitar nuestro sitio Web: www.bag-healthcare.com

O contactar con nosotros en: info@bag-healthcare.com

Instrucciones de Uso en otros idiomas, consultar:

<http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/>

o marcar: +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

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

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