

ES

Instrucciones de uso

# BAGene SSP Kits

Ver manual de instrucciones en formato digital: [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)



Kits de prueba para determinación de grupo sanguíneo ABO, RH, Kell, sistemas Kidd y Duffy, sistema MNS, sistemas de grupo sanguíneo raros, especificidades HPA y HNA sobre una base de genética molecular

**Listo para usar pre-alicuotadas**

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

## Contenido

1.	Descripción del producto	2
2.	Material	2
2.1	Contenido de los kits BAGene	2
2.2.	Material requerido pero no incluido	2
2.3.	Almacenamiento y estabilidad	3
3.	Datos de desempeño	3
4.	Procedimiento de prueba	3
4.1.	Condiciones de seguridad y observaciones especiales	3
4.2.	Extracción de ADN	4
4.3.	Amplificación	4
4.4.	Electroforesis en Gel	6
4.5.	Documentación	7
4.6.	Interpretación de resultados y limitaciones del método	7
4.6.1.	Generalidades	7
4.6.2.	ABO-TYPE y ABO-TYPE variant	7
4.6.3.	RH-TYPE	8
4.6.4.	Partial D-TYPE	9
5.	Precauciones y Advertencias	9
6.	Resolución de problemas	10
7.	Referencias	10
8.	Símbolos utilizados en los rótulos	11

**Version: 14/2019 / Publicación: 06-2019**

## 1. Descripción del producto

Los kits BAGene son kits de diagnóstico de uso in vitro para ser usados por personal capacitado. Los kits se utilizan para determinar las especificidades de los grupos sanguíneos de donantes, receptores y mujeres embarazadas sobre una base de genética molecular. Los kits ABO-, ABO variant-, RH-(con Zigosidad D), Partial D-, Weak D- y KKD-TYPE sirven para completar, aclarar y confirmar los resultados serológicos. Los kits MNS, HPA, HNA y Rare-TYPE se pueden utilizar para la tipificación molecular sin pruebas serológicas adicionales, a menos que se indique lo contrario (consulte las normativas nacionales).

El material básico para la tipificación con kits BAGene es ADN purificado de leucocitos. El procedimiento de prueba se lleva a cabo utilizando primers de secuencia específicos (SSP)-(PCR) (consulte la Fig. 1). Este método se basa en el hecho de que la extensión del primer, y por lo tanto la PCR exitosa, de una coincidencia exacta en el extremo 3' de ambos primer. Como resultado, la amplificación se obtiene solo si los primers coinciden completamente con la secuencia blanco. El producto de la amplificación se visualiza posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa.

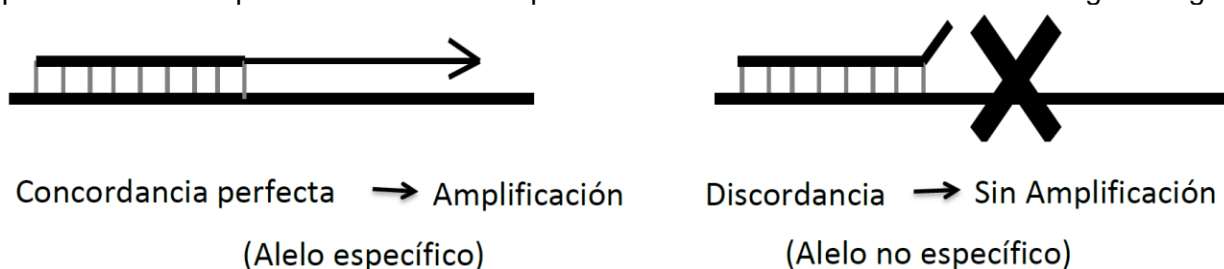


Fig. 1 Principio de la PCR-SSP

La composición de las mezclas individuales de primer permiten una clara identificación de los genotipos ABO, RH, KEL, JK, FY, MNSs, grupos sanguíneos raros, HPA y HNA indicados en las respectivas hojas de trabajo. Se utilizan un cierto número de mezclas de reacción pre-alicuatadas por tipificación. Se incluye un control interno de amplificación en cada mezcla de reacción.

## 2. Material

### 2.1. Contenido de los kits BAGene

- ◆ Placas/tiras de PCR para la genotipificación de grupo sanguíneo. Las mezclas de reacción pre-alicuatadas y deshidratadas consistentes en primers de alelo específico, primers de control interno, (específicos para el gen HGH (Hormona de crecimiento humano) o para una secuencia del cromosoma I (90 kbp 5' de Caja Resus) y nucleótidos. La mezcla de reacción Nro1 se encuentra marcada. El número de lote está impreso en cada placa/tira.
- ◆ Buffer PCR 10x
- ◆ 8 tapas de tira
- ◆ CD con información BAGene (contiene instrucciones de uso, hojas de trabajo y certificados de control de calidad)

## 2.2. Material requerido pero no incluido.

- ◆ Happy Taq (REF 70976) (u otra Taq Polimerasa, validada con el BAGene kits por el usuario). La Happy Taq se suministra sin cargo con la compra del kit BAGene.  
**No usar una Hot-start Taq Polimerasa (ej. Ampli Taq Gold)!**
- ◆ El kit **EXTRA GENE I** (REF 7059) (opcional) para extracción de ADN a partir de sangre/linfocitos/ leucocitos o material para otros métodos de extracción de ADN
- ◆ Pipetas a pistón (0.5 - 250 µl)
- ◆ Tips estériles con filtro integrado
- ◆ Termociclador (Ver pág. 6 lista de termocicladores validados)
- ◆ ADN agarosa
- ◆ Buffer TBE 0.5x (45 mM de Tris, 45 mM ácido bórico, 0.5 mM de EDTA)
- ◆ Bromuro de Etidio (BrEt)
- ◆ Unidad submarina de electroforesis
- ◆ Fuente de energía (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ DNA-length standard (REF 7097)
- ◆ Fuente de UV (Transiluminador, 220-310 nm)
- ◆ Sistema de documentación de Gel.

## 2.3. Almacenamiento y Estabilidad

Los kit BAGene son enviados a temperatura ambiente. La Happy Taq será enviada con hielo seco. Luego de la recepción, almacenar los reactivos a temperatura igual o inferior a -20°C. La fecha de vencimiento está indicada en la etiqueta de cada reactivo y es válida también para los reactivos una vez abiertos. La fecha de vencimiento que está indicada en la etiqueta externa se refiere al reactivo con la vida útil más corta dentro del kit.

El buffer de PCR 10x debe ser descongelado antes del uso.

## 3. Datos de desempeño

La composición de la mezcla de primer garantiza una identificación confinable de los alelos indicados en la hoja de trabajo, basados en los datos de secuencia actualmente conocidos.

La precisión y reproducibilidad de la especificidad de cada mezcla de primers fue verificada para cada lote con muestras de ADN control con especificidades conocidas.

Los alelos que no están incluidos y que actualmente no están probados debido a su rareza, están indicados en la hoja de trabajo (nt = no probados actualmente).

Se realizaron estudios de desempeño con muestras de ADN pretipificadas para todos los kit BAGene. Algunas mezclas no pudieron ser probadas para reacciones positivas debido a que son específicas para alelos raros que no están disponibles para realizar las pruebas. Esto está indicado en la hoja de trabajo. Los resultados fueron comparados con resultados de otros kits SSP de grupo sanguíneo, secuenciación o métodos de prueba para grupo sanguíneo serológico. Los resultados de tipificación mostraron un 100% de concordancia con los resultados de pretipificación.

La evaluación y controles de calidad de las mezclas se realizan con muestras de ADN que fueron extraídas por EXTRA GENE I (Método de salting out) o Qiagen QIAamp DNA Blood Mini y Maxi kits (Método basado en columnas). Cuando se usa otro kit de extracción de ADN, el usuario debe validar la idoneidad del ADN extraído para el uso con kits BAGene.

Los kits BAGene están validados con la Happy Taq (REF 70976). Si se utiliza otra Taq polimerasa, la enzima debe ser validada con los kits BAGene por el usuario.

Se garantiza una tipificación confiable utilizando de 50 - 100 ng de ADN por mezcla de reacción.

## 4. Procedimiento de prueba

## 4.1. Condiciones de seguridad y observaciones especiales

La PCR es un método altamente sensible, que debe ser realizado por personal bien entrenado con experiencia en técnicas de genética molecular y pruebas de grupo sanguíneo. Se deben seguir guías actualizadas de medicina transfusional, determinación de grupo sanguíneo, y anamnesis transfusional para reducir el riesgo de falsas tipificaciones, especialmente cuando se obtienen resultados discordantes con métodos serológicos o de genética molecular. La genotipificación de especificidades ABO, RHD/RHCE, Kell, Kidd y Duffy tienen que realizarse después de las pruebas serológicas.

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

- ◆ Usar guantes durante el trabajo (libres de polvo si es posible)
- ◆ Usar tips nuevos en cada paso de pipeteo (con filtro integrado)
- ◆ Usar áreas de trabajo separadas para pre-amplificación (extracción de ADN y preparación de las reacciones) y post-amplificación (electrophoresis en gel, documentación). Preferentemente utilizar dos habitaciones separadas.
- ◆ Utilizar dispositivos y otros materiales solo en los lugares indicados y no intercambiarlos.

## 4.2. Extracción de ADN

El material de muestra para la extracción de ADN genómico debe ser enviado en sistemas adecuados de recolección de sangre. La presencia de heparina potencialmente inhibe la PCR; por lo tanto los sistemas de recolección con heparina no son adecuados [2]. Se recomienda sangre con EDTA o Citrato para la tipificación.

Métodos validados para la extracción de ADN:

- EXTRA GENE I (BAG)
- QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini y Maxi Kit

Los métodos estándar de laboratorio establecidos para la extracción de ADN deben ser validados por el usuario.

El ADN debería tener los siguientes índices de pureza:

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

## 4.3. Amplificación

Todas las mezclas de reacción prealiquotadas ya contienen alelo y primers específicos de control 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. Retire el número requerido de placas/tiras de  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  y descongele el buffer PCR 10x.
2. Pipetear la mezcla maestra formada por buffer PCR 10x, solución de ADN, Taq-Polimerasa y agua destilada y mezclar bien. Los diferentes "kits" de BAGene funcionan con la misma mezcla maestra y por lo tanto se pueden combinar.

La composición de la mezcla maestra se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1: Composición de la mezcla maestra dependiendo del N° de mezclas de reacción:**

No. de mezclas	Agua Dest.	10x PCR buffer	Solución ADN (50-100 ng/μl) ♣	Happy Taq (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
18	166	21	21	1,7	210 μl

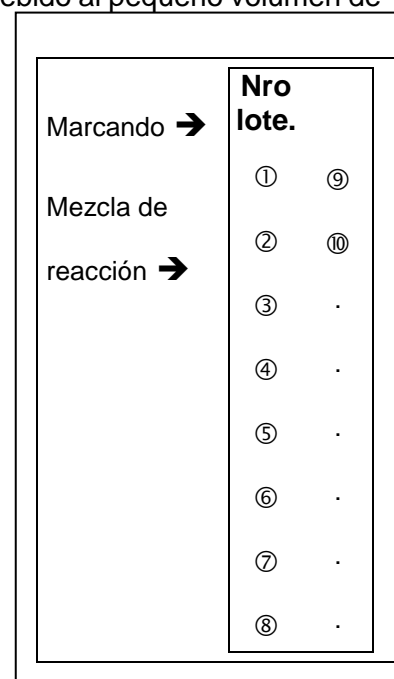
⇒ Para diferentes concentraciones de ADN, la cantidad de solución de ADN y agua deben ser ajustadas en consecuencia (ej. Para 12 mezclas: ADN (120 ng/μl): usar 5,8 μl ADN y 119 μl Agua dest.).

Si se debe utilizar otra Taq Polimerasa, la enzima debe ser validada con los kits BAGene por el usuario

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

3. Tras agitar en el vortex, añadir 10 μl de esta mezcla inmediatamente a las mezclas de reacción precargadas y secas (ver figura). Cambiar los tips tras cada paso de pipeteo. Cerrar bien los tubos con sus respectivos tapas. Asegurarse de no tocar con los dedos la parte interior de las tapas 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 hacia abajo la placa para disolver el pellet del fondo del tubo. Toda la solución de PCR debe quedarse en el fondo.

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!!





**Parámetros de Amplificación para todos los kits BAGene**

Programa-Paso	Tiempo	Temp.	No. De Ciclos
Desnat. Inicial	5 Min	96°C	1 Ciclo
Desnaturalización	10 Sec	96°C	5 Ciclos
Alineamiento+Extension	60 Sec	70°C	
Desnaturalización	10 Sec	96°C	10 Ciclos
Alineamiento	50 Sec	65°C	
Extension	45 Sec	72°C	
Desnaturalización	10 Sec	96°C	15 Ciclos
Alineamiento	50 Sec	61°C	
Extension	45 Sec	72°C	
Extension Final	5 Min	72°C	1 Ciclo

(Biometra)

**Termocicladores validados**

- PTC 200 / C1000 (MJ Research/ BioRad),
- GeneAmp PCR-System 9700 (usar tasa de calentamiento del 9600), Veriti (ABI),
- Mastercycler epGradient S (usar la función "simular gradiente de Mastercycler") (Eppendorf)
- Tprofessional

**¡¡ Por favor 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 lenta (~ 2.5°C/seg).**  
**Dado que los termocicladores de diferentes fabricantes funcionan 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 las siguientes pautas:

Si hay **reacciones falsas positivas** (bandas inespecíficas, tipos adicionales), aumentar la temperatura de alineamiento 1°C por paso.

Si hay **reacciones falsas negativas** (faltan bandas y/o controles de amplificación), disminuir la temperatura de alineamiento 1°C por paso y/o aumentar los tiempos de alineamiento 5 segundos por paso y/o aumentar los tiempos de desnaturalización 5 segundos por paso.

Se recomienda usar exclusivamente termocicladores calibrados con regularidad. Para el control del termociclador recomendamos **CYCLER CHECK (REF 7104, 71044)**.

**4.4. Electroforesis en GEL**

La separación de los productos de amplificación se realiza usando un gel de agarosa horizontal. Como tampón para la electroforesis, se recomienda buffer 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 mezclas de reacción completas en cada pocillo del gel. Además, aplicar 10µl de un marcador de peso molecular 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. Tras finalizar la corrida, se tiñe el gel en una solución de Bromuro de Etidio (EtBr) (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr en H<sub>2</sub>O o buffer TBE) durante 30 - 45 minutos. Como alternativa, el EtBr (0,5 µg/ml) se puede añadir al buffer de electroforesis o al gel de agarosa. Si fuese necesario, se puede eliminar el exceso de EtBr empapando el gel en H<sub>2</sub>O durante 20 - 30 minutos.

## 4.5. Documentación

Para la documentación, visualizar el amplificado de la PCR usando un transiluminador UV (220 - 310nm) y fotografiarlo con un sistema adecuado de documentación 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 resultados y limitaciones del método

### 4.6.1. General

Los resultados obtenidos con los “kits” BAGene son documentados en las hojas de tareas suministradas. En las hojas de tareas 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 del producto específico de ADN se indica en pb bajo los números de reacción en la hoja de trabajo. Se muestran posibles patrones de bandas en 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. En los “kits” ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, HPA-TYPE y HNA-TYPE están resaltados en **gris**, y en RH-TYPE además 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 marcador de peso molecular de ADN. Los tamaños correctos de los amplicones específicos se pueden observar en las hojas de trabajo. En todas las calles sin amplificación específica de alelo, se debe ver claramente una banda de **434 pb** del control interno. Una excepción es la reacción de PCR con mezcla N°2 del **RH-TYPE** que muestra un control interno de **659 pb**. ¡En la mayoría de los casos en los que hay una amplificación específica de alelo la banda del control interno es más débil o ausente!. Si no hay una banda específica y no aparece la banda de control interno, el resultado con la mezcla relevante no puede ser usado para la evaluación.

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 pautas nacionales de transfusión en concordancia con los tipajes serológicos. Se recomienda el análisis por secuenciación de esas muestras. Los resultados de tipaje se deben interpretar teniendo en cuenta la variación genética de los diferentes grupos étnicos. En caso de duda, el fenotipo es válido.

### 4.6.2. ABO-TYPE y ABO-TYPE variant

La expresión homocigota de los alelos ABO\*O.01, ABO\*O.02, ABO\*B.01, ABO\*A2.01 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\*A1.01 se indica sólo por bandas en todas las cuatro “no-reacciones” (2, 4, 6, 8), dado que no hay ninguna preparación específica para ABO\*A1.01. La constelación de heterocigosis de ABO\*A1.01 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\*A1.01**. Dado que sólo una selección de alelos de la *variante B* y ningún alelo de la *variante A*<sup>2</sup> pueden ser detectados por el “kit” ABO-TYPE variant, otros alelos de las *variantes B* o *A*<sup>2</sup> pueden estar ocultos por los resultados de PCR **ABO\*B.01** y **ABO\*A2.01** respectivamente. La mayoría de los alelos B<sup>(A)</sup> y *cis AB* también muestran un resultado positivo en la reacción ABO\*B.01. Aparece una banda específica para la HGH con una longitud de 434 pb como control interno. Consultar también las observaciones especiales en las hojas de trabajo de los “kits” ABO-TYPE y ABO-TYPE variant.



### 4.6.3. RH-TYPE

La determinación genética molecular de RHD estándar así como de algunas variantes RHD (haplotipos RHD positivos en especímenes serológicamente D negativos, D parcial, D<sub>el</sub>) y la zigosidad D son realizados en reacciones de PCR designadas.



Las preparaciones 1 y 2 son reacciones de PCR Múltiplex para examinar 5 polimorfismos de *RHD* (intrón 4 y 7 de *RHD*, exón 7, así como la detección específica de *RHD\*01N.08* (W16X) y *RHD\*08N.01* ( $\Psi$ )). Esto significa, que en contraste con todos los otros “kits” BAGene (excepto para la banda del control interno) no sólo uno, sino también dos amplicones específicos pueden ocurrir en una reacción de PCR. Para facilitar la evaluación, los cuadros respectivos están divididos cuando dos bandas posibles aparecen y tienen un fondo bicolor. Las longitudes de los fragmentos de los productos de PCR y los polimorfismos están también identificados con un color específico según los cuadros del patrón de reacción. Se recomienda utilizar un marcador de peso molecular de ADN.

#### Ejemplo *RHD\*08N.01* ( $\Psi$ ):

Reacción No 1: Tienen que aparecer dos bandas específicas en el gel.

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

Reacción No 2: Tienen que aparecer dos bandas específicas en el gel.

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

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 HGH como control interno. Excepción: la reacción de PCR no 2 donde aparece una banda control de 659bp.

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

#### Zigosidad D

En el kit RH-TYPE también es posible tipificar el estado Zigosidad RHD DD, Dd o dd. Por lo tanto, se requiere la presencia o ausencia de la caja Rhesus Upstream (U<sub>BOX</sub>) en la reacción N°10 y la caja Rhesus híbrida (H<sub>BOX</sub>) en la reacción N°11.

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* “Upstream” muestra la presencia de un alelo *RHD* (*RHD* pos.), excepto homocigotos y hemizigotos *RHD\*08N.01*( $\Psi$ ) respectivamente. La reacción de la mezcla 10 puede ser negativa aunque un alelo *RHD* esté presente.

Además, el resultado de la Mezcla 10 con una caja Rhesus Upstream modificada genéticamente



(por ejemplo, para D débil 4.2 (DAR1)) puede ser también falso negativo, aunque la muestra es serológicamente D-positiva. Para verificar ese tipo de discrepancias, el RH-TYPE contiene reacciones para detectar RHD\*08N.01(Ψ) y D débil 4.2 (DAR1). Por lo tanto, con un resultado serológico D positivo 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 ocurre.

Debido a un polimorfismo distintivo en la *Caja Rhesus* Híbrida de africanos, puede aparecer un resultado falso positivo en presencia de RHD\*08N.01 (Ψ) y otro alelo RHD. 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 demuestra o bien por la única presencia de las bandas del control interno o por la ausencia completa de bandas

#### 4.6.4. Partial D-TYPE

Una banda perdida en la reacción N° 4 puede indicar DFR (serología: positivo débil con anti-D) o RHD\*08N.01 (Ψ) (en serología D negativo hemi- u homocigoto). Si falta la información serológica, la confirmación o exclusión de RHD\*08N.01 (Ψ) se puede obtener usando el "kit" RH-TYPE. En presencia de RHD\*débil D tipo 41 (RHD\*01W.41) y RHD\*débil D tipo 45 (RHD\*01W.45) puede ocurrir una pérdida de reacción de la mezcla 9. Las mutaciones de secciones de intrón también pueden conducir a una pérdida de reacción en la mezcla N° 8 ó 9. En presencia de RHD\*débil D tipo 20 (RHD\*01W.20) la reacción N° 10 normalmente no muestra banda, pero a veces aparece una banda débil.

Una diferenciación molecular de las variantes D RHD\*DCS, \*DFW, \*DIM, \*DNU del RHD actualmente no es posible. La consideración de los haplotipos es útil.

### 5. Avisos y Precauciones

El Bromuro de Etidio es un potente mutagénico. Evitar el contacto con la piel y contaminaciones. Consulte 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 UV!

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 inactivar antes de desechar (por ejemplo en un autoclave). Los materiales desechables se deben autoclavar 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 inactivar antes de desecharlos (p. ej. en un 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-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)

## 6. Solución de problemas

Problema	Razón posible	Solución
no amplificación, estandar de longitud visible	ADN contaminado con inhibidores de PCR, ADN degradado	repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos
	concentración de ADN demasiado alta/ demasiado baja	cambiar concentración de ADN, repetir extracción de ADN
	no hay enzima o concentración demasiado baja	repetir tipaje, cambiar concentración de la enzima
	ADN de sangre heparinizada	repetir tipaje con sangre anticoagulada con EDTA
	parámetros de amplificación incorrectos	optimizar los parámetros de amplificación (ver 4.3) ☆
falla repetida en calles individuales (no amplificación de control)	fuga 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 ignoradas)	contaminación con otros productos de amplificación.	decontaminación, repetir tipaje, asegurar condiciones de trabajo limpias
	ADN contaminado con sales	repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos
	concentración de ADN demasiado alta	usar menos ADN
	concentración de enzimas demasiado alta	usar menos enzima
parámetros de amplificación incorrectos	optimizar los parámetros de amplificación (ver 4.3) ☆	
la evaluación muestra más de 2 especificidades	contaminación por arrastre (productos de amplificación!) nuevo alelo	comprobar mezclas de tipificación sin agregado de ADN, decontaminación, asegurar condiciones de trabajo limpias
ninguna o sólo bandas débiles visibles, estándar de longitud invisible	tinción con EtBr demasiado débil	repetir tinción
el fondo del gel tiene demasiado brillo	La tinción duró demasiado, concentración de EtBr demasiado alta	sumergir el gel en agua o TBE, disminuir la concentración de EtBr
bandas borrosas	buffer de electroforesis demasiado caliente o agotado, buffer de electroforesis incorrecto, incompleta polimerización del gel	disminuir el voltaje, usar buffer TBE 0,5x, use gel polimerizado completamente

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 variación en el tamaño.






## 7. Referencias

- Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
- Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166

Additional references see [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com).



## 8. SIMBOLOS UTILIZADOS EN EL RÓTULO

	Usar por
	Temperatura de almacenamiento / Limite inferior de temperatura
	Consulte las instrucciones de uso
	Suficiente para n pruebas
	Elaborador
<b>BLOOD TYPING</b>	Finalidad prevista: Tipificación sanguínea
<b>CONT</b>	Contenido, contiene
<b>HNA TYPING</b>	Finalidad prevista: Determinación de especificidades HNA
<b>HPA TYPING</b>	Finalidad prevista: Determinación de especificidades HPA
<b>BAGene INFORMATION CD</b>	CD (contiene instrucciones de uso, hoja de trabajo, certificados de control de calidad)
<b>eIFU   VXX/XXXX</b>	Instrucciones electrónicas de uso Version de instrucciones de uso vigente
<b>IVD</b>	Para uso diagnóstico in vitro
<b>LOT</b>	Lote
<b>PCRBUF   10x</b>	PCR buffer, 10x concentrado
<b>PCRCAP</b>	Tapas de PCR
<b>PCRPLATE</b>	Placas de PCR
<b>PCRSTRIP</b>	Tiras de PCR
<b>REACTIONMIX</b>	Mezclas de reacción
<b>REF</b>	Número de catálogo
<b>RTU</b>	Listo para usar
<b>TAQ POLYMERASE</b>	Taq-Polimerasa

Encuentre más información e instrucciones de uso en otros idiomas en nuestro sitio web <http://www.bag-diagnostics.com> o contáctenos directamente a [info@bag-diagnostics.com](mailto:info@bag-diagnostics.com) o al teléfono: +49 (0)6404-925-125