

PT

Instruções de utilização

Kits SSP BAGene

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



Kits de teste para a tipagem de grupos sanguíneos ABO, tipos RH, sistemas Kell, Kidd e Duffy, MNS, sistemas raros de grupos sanguíneos, especificidades HPA por 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	6650	KKD-TYPE
REF	6652	MNS-TYPE
REF	6653	Rare-TYPE
REF	6660	HPA-TYPE
REF	66701	HNA-TYPE

Conteúdos

1. Descrição do produto.....	2
2. Material.....	2
2.2. Material requerido mas não fornecido.....	2
2.3. Armazenamento e Estabilidade.....	3
3. Dados de Desempenho.....	3
4. Porcedimento de teste.....	4
4.1. Condições de Segurança e notas especiais.....	4
4.2. Isolamento de DNA.....	4
4.3. Amplificação.....	4
4.4. Eletroforese em gel.....	6
4.5. Documentação.....	7
4.6. Interpretação de resultados e limitações do método.....	7
4.6.1. Geral.....	7
4.6.2. ABO-TYPE e ABO-TYPE variant.....	7
4.6.3. RH-TYPE.....	8
4.6.4. Partial D-TYPE.....	9
4.6.5. D Zygosity-TYPE.....	9
5. Avisos e Precauções.....	9
6. Resolução de problemas.....	10
7. Referencias.....	11
8. Explicação dos símbolos usados nos rótulos.....	11

Versão: 14/2019 / Emissão: 2019-06

1. Descrição do produto

Os **Kits BAGene** são dispositivos de diagnóstico *in vitro* para utilização por profissionais qualificados. Os kits são usados para a genotipagem das especificidades sanguíneas de dadores, recetores e mulheres grávidas por genética molecular. Os kits ABO-, ABO variant, RH (com D Zigotia)-, Partial D-, Weak D- e KKD-TYPE servem para completar, clarificar e confirmar resultados serológicos. Os kits The MNS-, HPA-, HNA- e Rare-TYPE podem ser usados para genotipagem sem testes serológicos adicionais, salvo se especificado o contrário (consulte as suas regulamentações nacionais).

O material básico para a tipagem com os **Kits BAGene** é o DNA purificado de leucócitos. O procedimento de teste é realizado usando o PCR-Sequence Specific Primers (SSP) (ver Fig. 1). Este método baseia-se no facto da extensão do primer e a consequente PCR bem-sucedida dependerem da correspondência exata da extremidade 3' de ambos os primers. Como resultado, a amplificação é obtida apenas se os primers correspondem totalmente à sequência alvo. O produto da amplificação é subsequentemente visualizado por eletroforese em gel de agarose.

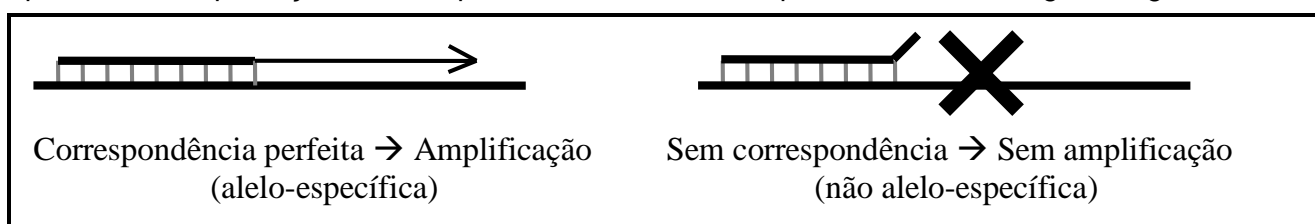


Fig. 1: Princípio da reação de PCR-SSP

A composição das misturas individuais de primers permite a identificação clara dos génotipos ABO, RH, KEL, JK, FY, MNSs, grupos sanguíneos raros, HPA e HNA indicados na respetiva ficha de trabalho. Por cada tipagem é usado um número determinado de misturas de reação **pré-aliquotadas secas**. Em cada mistura de reação é incluído 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 contêm primers alelo-específicos, primers 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.
- ◆ Tampão de PCR 10x
- ◆ 8 tampas de tiras
- ◆ CD de Informação BAGene (contendo as instruções de utilização, fichas de trabalho e o certificado de controlo da qualidade)

2.2. Material requerido mas não fornecido

- ◆ 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 Kits BAGene.
Não use uma *Hot-start* Taq polimerase (p. ex., Ampli Taq Gold)!

- ◆ Kit **EXTRA GENE I** (REF 7059) (opcional) para a extração de DNA de sangue/ linfócitos/ leucócitos ou material para outros métodos de extração de DNA
- ◆ Micropipetas (0,5 - 250 µl)
- ◆ Pontas com filtro integrado esterilizadas
- ◆ Termociclador (lista de termocicladores validados, consultar página 6)
- ◆ Agarose específica de DNA
- ◆ Tampão TBE 0,5x (45 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA)
- ◆ Brometo de etídio (EtBr)
- ◆ Unidade de eletroforese de imersão
- ◆ Abastecimento energético (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ Marcador de peso molecular de DNA (REF 7097)
- ◆ Fonte UV (transiluminador, 220-310 nm)
- ◆ Sistema de documentação de gel

2.3. Armazenamento e Estabilidade

Os kits são entregues à temperatura ambiente. A Happy Taq será fornecida em 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 de PCR 10x pouco tempo antes da utilização.

3. Dados de Desempenho

A composição da mistura de primers 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 primers foram verificadas para cada lote com amostras de DNA controlo com especificidades conhecidas. Os alelos, que não estão incluídos e que não foram testados atualmente por serem raros, estão indicados na ficha de trabalho (nt = não testados atualmente).

Estudos de desempenho, com amostras de DNA previamente tipadas, foram realizados para todos os kits da BAGene. Algumas misturas não puderam ser testadas para reações positivas, uma vez que estas são específicas de alelos raros que não estão disponíveis para teste. Este facto está indicado no diagrama de avaliação ou na tabela específica. Os resultados foram comparados com os resultados de outros kits SSP de grupos sanguíneos, por métodos de sequenciação ou por testes serológicos de grupos sanguíneos. Os resultados da tipagem obtidos foram 100% concordantes com os resultados da pré-tipagem.

A avaliação e o controlo da qualidade das misturas foram realizados com amostras de DNA extraídas através do kit EXTRA GENE I (método de extração por sal), ou pelos kits Qiagen QIAamp DNA Blood Mini e Maxi (método de extração por coluna). Quando outro kit de extração de DNA é utilizado, a adequação do DNA extraído para aplicação com kits BAGene deve ser validado pelo utilizador.

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

É garantida uma tipagem fiável usando 50 - 100 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 grupos sanguíneos. As diretrizes atualizadas sobre medicina de transfusão, determinação de grupos sanguíneos e anamnese de transfusão devem ser consultadas de forma a reduzir o risco de tipagens falsas, especialmente quando são obtidos resultados diferentes com métodos serológicos e métodos moleculares. A genotipagem das especificidades ABO, RHD/RHCE, Kell, Kidd e Duffy tem de ser realizadas 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 em cada passo de pipetagem (com filtro integrado).
- ◆ Use áreas de trabalho separadas para a pré-amplificação (isolamento de DNA 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 DNA

O material amostral para o isolamento de DNA genómico deve ser enviado em sistemas próprios para recolha sanguínea. A presença de heparina inibe potencialmente a PCR; deste modo os sistemas de recolha sanguínea com heparina não são apropriados [2]. É recomendada a utilização de sangue em EDTA ou Citrato para a tipagem.

Métodos de extração de DNA validados:

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

Métodos laboratoriais internos de isolamento de DNA estabelecidos devem ser validados pelo utilizador.

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 já contêm primers alelo-específicos e controlo-específicos e nucleótidos. Estas são fornecidas secas nos tubos de reação. Os parâmetros de amplificação são otimizados para 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 tampão de PCR 10x, solução de DNA, Taq-polimerase e água destilada e misture bem. Os diferentes kits BAGene funcionam com a mesma mistura principal e podem consequentemente ser combinados.

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.	Tampão de PCR 10x	Solução de DNA (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
18	166	21	21	1,7	210	μl

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

3. Depois de agitar no vortex, adicione de imediato 10 μl desta mistura às misturas de reação pré-aliquotadas e secas (ver figura). Mude a ponta após cada passo de pipetagem. Feche bem os tubos com as respetivas 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 ajustável, também é possível usar protetor de PCR reutilizáveis. Agite ligeiramente a placa para baixo para dissolver os pellets no fundo da placa. A solução de PCR completa deve estabelecer-se no fundo.

4. Coloque os tubos de reação no termociclador e ajuste a tampa para que os tubos de reação não se deformem com o calor. Inicie o programa de PCR. Não é necessário adicionar óleo mineral às misturas de reação se for usada uma tampa aquecida e ajustada!

Marcação →	Lot-Nr.	
	①	⑨
Mistura de	②	⑩
	③	.
reação →	④	.
	⑤	.
	⑥	.
	⑦	.
	⑧	.

Parâmetros de amplificação para todos os Kits BAGene

Programa-passo	Tempo	Temp.	N.º de ciclos	Termocicladores validados
Desnaturação inicial	5 min.	96 °C	1 ciclo	PTC 200 / C1000 (MJ Research/ BioRad)
Desnaturação	10 seg.	96 °C	5 ciclos	
Emparelhamento+extensão	60 seg.	70 °C	10 ciclos	GeneAmp PCR-System 9700 (usar taxa de aquecimento de 9600), Veriti (ABI)
Desnaturação	10 seg.	96 °C		
Emparelhamento	50 seg.	65 °C		
Extensão	45 seg.	72 °C	15 ciclos	Mastercycler epGradient S (usar função "simulate Mastercycler gradiente") (Eppendorf)
Desnaturação	10 seg.	96 °C		
Emparelhamento	50 seg.	61 °C		
Extensão	45 seg.	72 °C		
Extensão final	5 min.	72 °C	1 ciclo	Tprofessional (Biometra)

Não use um bloco de aquecimento em 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.).

Uma vez que termocicladores de diferentes fabricantes têm um desempenho diferente e até mesmo 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:

Para reações **falso-positivas** (bandas inespecíficas, tipos adicionais): Aumente a temperatura de emparelhamento em 1°C por passo.

Para reações **falso-negativas** (bandas e/ou controlos em falta): Diminua a temperatura de emparelhamento em 1°C por passo e/ou aumente os períodos de emparelhamento 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 de agarose horizontal. Como tampão de eletroforese, é recomendado TBE 0,5x (45mM de Tris, 45mM de ácido bórico, 0,5mM de EDTA). A concentração do gel deve ser de 2,0 - 2,5% de agarose. Deixe o gel polimerizar pelo menos 30 minutos antes de carregar as amostras.

Depois da amplificação ter sido concluída, retire as amostras do termociclador e carregue a totalidade das misturas de reação cuidadosamente em cada poço do gel. Adicionalmente, aplique 10 µl do marcador de peso molecular de DNA de forma a compara o tamanho das bandas. A separação por eletroforese é feita a 10 - 12 V/cm (com 20 cm de distância entre os elétrodos aproximadamente 200-240 V), durante 20 - 40 minutos. Após a eletroforese ter sido concluída, o gel é tingido numa solução de brometo de etídio (EtBr) durante 30 - 45 minutos (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 em gel. Escolha o tempo de exposição e a abertura de forma a que as bandas visíveis 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 de 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 auxiliar 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 com destaque suplementar 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 fragmento padrão do marcador de DNA devem ser consideradas como positivas. Os tamanhos corretos das bandas específicas podem ser encontrados na ficha de trabalho. Em todas as linhas sem amplificação alelo-específica tem de aparecer o controlo interno a **434 bp**. A exceção é a reação de PCR da **mistura n.º 2 do RH-TYPE** que apresenta um controlo interno com **659 bp**. Na maioria dos casos em que haja uma amplificação alelo-específica, o controlo interno é mais fraco ou ausente! Se não aparecer nem a banda específica nem a banda de controlo interno, o resultado com cuja a mistura seja relevante não deve ser usado para avaliação.

Para 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 primers existentes), devem ser seguidas as diretrizes de transfusão nacionais de acordo com as tipagens serológicas. É recomendada a sequenciação dessas amostras. Os resultados da tipagem 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*O.01*, *ABO*O.02*, *ABO*B.01*, *ABO*A2.01* é indicada por intermédio das bandas na reação de PCR correspondente (1, 3, 5 ou 7). Em heterozigotia, as quatro "não reações" têm de ter uma banda no gel (2, 4, 6 e 8) para além das duas reações de PCR específicas (1, 3, 5, 7). A homozigotia do alelo *ABO*A1.01* é indicada apenas por bandas nas quatro "não reações" (2, 4, 6, 8), uma vez que não existe uma preparação específica para *ABO*A1.01*. O padrão heterozigótico de *ABO*A1.01* pode ser reconhecido através da presença de 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 da variante *A* pode ser detetada pela ABO-TYPE variant, outros alelos da variante *A* podem ser ocultados pelo resultado de PCR **ABO*A1.01**. Como apenas uma seleção de alelos da variante *B* e nenhum alelo da variante *A*² pode ser detetado pela ABO-TYPE variant, outros alelos da variante *B* ou da variante *A*² podem ser ocultados pelos resultados de PCR **ABO*B.01** and **ABO*A2.01**, respetivamente. A maioria dos alelos *B*^(A) e *cis AB* também apresentam um resultado positivo na reação **ABO*B.01**.

Uma banda que é específica do HGH com 434 bp de comprimento, aparece como controlo interno.

Consulte também as notas especiais nas fichas de trabalho do ABO-TYPE e ABO-TYPE variant.

4.6.3. RH-TYPE



A tipagem genética do padrão *RHD* assim como de algumas variantes do *RHD* (*RHD* - haplotipos positivos em espécimes serológicos D negativos, D parcial, D_{e1}) e a D Zigotia é realizada nas reações de PCR correspondentes.

As preparações 1 e 2 são reações de PCR-Multiplex para analisar cinco polimorfismos *RHD* (*RHD* intrão 4 e 7, exão 7, assim como a deteção específica do *RHD*01N.08* (W16X) e do *RHD*08N.01* (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 podem existir duas bandas possíveis apresentando um fundo de duas cores. Os comprimentos dos por fragmentos de PCR e os polimorfismos são também identificados com uma cor específica de acordo com as caixas para o padrão de reação. É recomendada a utilização do marcador de peso molecular de DNA.

Exemplo *RHD*08N.01* (Ψ):

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

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

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

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

As reações PCR designadas são para a determinação molecular genética das características do locus genético de *RHCE*. Uma banda, específica para HGH, com um comprimento de 434 bp, aparece como controlo interno. Uma exceção é a reação de PCR n.º 2, em a banda de controlo aparece a 659 bp.

Se um padrão de reação indicar uma variante *RHD*, 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*08N.01* (Ψ) (hemi ou homocigótico D-negativo em serologia). Se a informação serológica estiver em falta, a confirmação ou exclusão do *RHD*08N.01* (Ψ) pode ser obtida usando RH-TYPE. Na presença do tipo RHD*D-fraco tipo 41 (*RHD*01W.41*) e RHD*D-fraco tipo 45 (*RHD*01W.45*), pode ocorrer ausência de reação na mistura n.º 9. Mutações nas secções intrónicas podem também levar á ausência de reação na mistura n.º 8 ou 9. Na presença de RHD*D-fraco tipo 20 (*RHD*01W.20*), a reação n.º 10 normalmente não apresenta banda, mas, por vezes, aparece uma banda fraca.

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

4.6.5. D Zygosity-TYPE

No kit RH-TYPE é possível tipar um padrão de RHD-Zigotia: DD, Dd ou dd. Deste modo é requerida a presença ou ausência da Upstream *Rhesus-Box* (U_{BOX}) na reação n.º10 e da *Rhesus Hybrid-Box* (H_{BOX}) na reação n.º 11.

Para os alelos RHD, que não podem ser determinados serologicamente (RhD neg.), pode ocorrer uma discrepância entre o resultado do teste sorológico e a genotipagem. A detecção positiva da *Rhesus Box Upstream* demonstra a presença de um alelo RHD (RHD pos.), exceto para o *RHD*08N.01* (Ψ) homocigótico e hemizigótico, respectivamente. A mistura de reacção 10 pode ser negativa embora esteja presente um alelo RHD.

Além disso, o resultado da mistura 10 com uma Upstream *Rhesus Box* geneticamente modificada (por exemplo, para o D-fraco 4.2 (DAR1)) também pode ser falso negativo, embora a amostra seja serologicamente D-positiva. Para verificar este tipo de discrepâncias, o RH-TYPE contém reações para detectar *RHD*08N.01* (Ψ) e D-fraco 4.2 (DAR1). Assim, com um resultado serológico D-positivo e um PCR positivo para o *Hybrid Rhesus Box*, o resultado final é "Dd." O resultado final será "DD" quando se obtiver um resultado de PCR negativo para o *Hybrid Rhesus Box*.

Devido a um polimorfismo distintivo na *Hybrid Rhesus Box* de Africanos, pode ocorrer um resultado falso positivo na presença de *RHD* 08N.01* (Ψ) e outro alelo RHD.

Alelos RHD antigéneo D-negativo adicionais não podem ser excluídos com os kits atualmente disponíveis. Isso deve ser considerado na interpretação dos resultados. No entanto, a incidência desses alelos na população caucasóide é bastante baixa.

O DNA degradado pode conduzir a resultados falso-negativos. Isso é evidenciado pela presença apenas das bandas de controlo interno ou pela completa ausência 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 UV!

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 no procedimento do 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 declaração da ficha de segurança (MSDS) está disponível para download em; www.bag-diagnostics.com.

6. Resolução de problemas

Problema	Possível motivo	Solução
Sem amplificação, Marcador de peso molecular visível	DNA contaminado com inibidores de PCR, DNA degradado.	Repetir o isolamento de DNA, tente métodos diferentes
	Concentração de DNA demasiado alta/baixa	Alterar a concentração de DNA repetir o isolamento de DNA
	A enzima está em falta ou a concentração é demasiado baixa	Repetir a tipagem, alterar a concentração de enzima
	DNA de sangue heparinizado	Repetir tipagem com sangue em EDTA
	Parâmetros de amplificação errados	Otimizar os parâmetros de amplificação (consultar 4.3) ☆
Falha repetitiva na mesma mistura (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 tipagem, assegurar condições de trabalho limpas
	DNA contaminado com sais	Repetir isolamento de DNA, tentar métodos diferentes
	Concentração de DNA demasiado alta	Usar menos DNA
	Concentração de enzima demasiado alta	Usar menos enzima
	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 tipagem sem adicionar DNA, descontaminação, assegurar condições de trabalho limpas
Nenhuma banda visível, ou apenas bandas muito fracas visíveis, Marcador de peso molecular invisível	Tingimento com EtBr muito fraco	Repetir tingimento
Fundo de gel demasiado brilhante	Tingimento com EtBr 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. Referencias

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

Para referências adicionais consulte www.bag-diagnostics.com.

8. Explicação dos símbolos usados nos rótulos

	Prazo de validade
	Temperatura de armazenamento / Limite inferior de temperatura
	Consulte as instruções de utilização
	Suficiente para "n" ensaios
	Fabricante
BLOOD TYPING	Utilização prevista: Tipagem do grupo sanguíneo
CONT	Conteúdo, contém
HNA TYPING	Utilização prevista: Determinação de especificidades do HNA
HPA TYPING	Utilização prevista: Determinação de especificidades do HPA
BAGene INFORMATION CD	CD (contem instruções de utilização, ficha de trabalho, certificado de controlo da qualidade)
eIFU VXX/XXXX	Instruções de utilização eletrónica Versão atualizada das instruções de utilização
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
LOT	Código do lote
PCRBUF 10x	Tampão de PCR, 10x concentrado
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

Find further information and instructions for use in other languages on our website <http://www.bag-diagnostics.com> or contact us directly at info@bag-diagnostics.com or phone: +49 (0)6404-925-125