

HLA-B 57 plus 1.0 Typing Kit

Dispositivo para utilização *in vitro*

Manual de Instruções



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede
portugal

tel + 351 231 410 946
fax + 351 231 410 947
e-mail info@genebox.com
www.genebox.com



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

Versão1.4, Maio 2010.

CE 0197

CE 0197



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede
portugal

tel + 351 231 410 946
fax + 351 231 410 947
e-mail info@genebox.com
www.genebox.com



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede
portugal

tel + 351 231 410 946
fax + 351 231 410 947
e-mail info@genebox.com
www.genebox.com

13. Hughes DA, Vilar FJ, Ward CC, Alfirevic A, Park BK, Pirmohamed M. Cost-effectiveness analysis of HLA B*5701 genotyping in preventing abacavir hypersensitivity. *Pharmacogenetics*. 2004;14:335-42.
14. Hughes AR, Mosteller M, Bansal AT, Davies K, Haneline SA, Lai EH, Nangle K, Scott T, Spreen WR, Warren LL, Roses AD: CNA30027 Study Team; CNA30032 Study Team. Association of genetic variations in HLA-B region with hypersensitivity to abacavir in some, but not all, populations. *Pharmacogenomics*. 2004;5:203-11.
15. Gillespie GM, Stewart-Jones G, Rengasamy J, Beattie T, Bwayo JJ, Plummer FA, Kaul R, McMichael AJ, Easterbrook P, Dong T, Jones EY, Rowland-Jones SL. Strong TCR Conservation and Altered T Cell Cross-Reactivity Characterize a B*57-Restricted Immune Response in HIV-1 Infection. *J Immunol*. 2006 Sep 15;177(6):3893-902.



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede
portugal

tel + 351 231 410 946
fax + 351 231 410 947
e-mail info@genebox.com
www.genebox.com

Índice

Apresentação.....	4
Alterações e Melhoramento do produto.....	4
Controlo da Qualidade	5
Validação – Linhas Celulares.....	5
Componentes do HLA-B 57 plus 1.0 Typing Kit.....	6
Protocolo de amplificação por PCR.....	7
Reagentes.....	7
Extracção de DNA.....	7
Amplificação por PCR	7
Parâmetros do programa de PCR.....	8
Protocolo de electroforese em gel de agarose.....	9
Preparação do gel a 2%.....	9
Electroforese.....	9
Esquema da placa HLA-B 57 plus 1.0	10
Identificação da placa HLA-B 57 plus 1.0	10
Folha de interpretação dos Resultados	11
Tabela de interpretação dos Resultados	11
Guia de resolução de problemas	12
Avisos e precauções	13
Guia técnico	14
Garantia	15
Aviso de Garantia	16
Declaração de Conformidade	17
Folha de dados de segurança.....	18
Referências.....	21

Apresentação

Alguns subtipos do gene HLA-B*57 estão associados a uma progressão lenta da doença em doentes infectados pelo HIV-1, particularmente o alelo B*5701 em caucasianos e B*5703 em africanos. A presença deste alelo (B*5701) tem sido também fortemente associado com a hipersensibilidade relacionada com ABACAIVIR.

O HLA-B*57 tem vindo também a ser associado a infecção pelo HCV e Psoríase.

Este kit contém tiras com misturas de primers desidratadas e PCR Master Mix para efectuar a identificação do alelo HLA-B5701.

Alterações e melhoramento do Produto

O kit HLA-B*57 Single está constantemente a ser actualizado, ao nível da sua especificidade e interpretação, de modo a incluir novas associações a doença que venham a ser descritas. Este produto pode também ser melhorado de modo a aumentar o seu rendimento.

As alterações, adições ou modificações de primers, em relação ao lote anterior estão detalhadas na tabela abaixo:

Tubo	Primers	motivo
N/A		

Referências

1. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilising sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46: 355-367.
2. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron, Dupont B, Erlich HA, Fauchet R, Bach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA System, 1996. *Hum Immunol* 1997, 53: 98-128.
3. Nomenclature for factors of the HLA System. Compiled by Steven G. E. Marsh for the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. <http://www.anthonynolan.com/HIG/nomenc.html>
4. Schaffer M, Olerup O. HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing. *Tissue Antigens*. 2001; 58: 299-307.
5. Phillips E, Mallal S. Drug hypersensitivity in HIV. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7:324-30.
6. Waters LJ, Mandalia S, Gazzard B, Nelson M. Prospective HLA-B*5701 screening and abacavir hypersensitivity: a single centre experience. *AIDS*. 2007;21:2533-4.
7. Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, Sayer D, Castley A, Mamotte C, Maxwell D, James I, Christiansen FT. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet*. 2002;359:727-32.
8. Vilar FJ, Naisbitt DJ, Park BK, Pirmohamed M. Mechanisms of drug hypersensitivity in HIV-infected patients: the role of the immune system. *J HIV Ther*. 2003;8:42-7.
9. Lucas A, Nolan D, Mallal S. HLA-B*5701 screening for susceptibility to abacavir hypersensitivity. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:591-3.
10. Chui CK, Brumme ZL, Brumme CJ, Yip B, Phillips EJ, Montaner JS, Harrigan PR. A simple screening approach to reduce B*5701-associated abacavir hypersensitivity on the basis of sequence variation in HIV reverse transcriptase. *Clin Infect Dis*. 2007;44:1503-8.
11. Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, Jägel-Guedes E, Rugina S, Kozyrev O, Cid JF, Hay P, Nolan D, Hughes S, Hughes A, Ryan S, Fitch N, Thorborn D, Benbow A; PREDICT-1 Study Team. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med*. 2008;358:568-79.
12. Sun HY, Hung CC, Lin PH, Chang SF, Yang CY, Chang SY, Chang SC. Incidence of abacavir hypersensitivity and its relationship with HLA-B*5701 in HIV-infected patients in Taiwan. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:599-604.

Folha de Dados de Segurança (3/3)

Material Safety Data Sheet (MSDS)

12. Informação ecológica

Não existem dados disponíveis.

13. Informação sobre a eliminação de resíduos

Elimine o material de acordo com toda a regulamentação aplicável (os resíduos devem ser devidamente tratados e/ou incinerados).

14. Informação sobre o transporte

No transporte dos Kits devem estar asseguradas as temperaturas, não devendo ultrapassar os 25°C. A duração do transporte não deve ser superior a 3 dias, de modo a garantir que todos os componentes do Kit cheguem em perfeitas condições aos seus destinatários.

15. Contactos Úteis

Número Nacional de Emergência: 112

Centro de Informação Anti-Venenos: 808 250 143

16. Outras informações

As informações a cima disponíveis são baseados no nível de conhecimento actual, devendo ser utilizado apenas como guia. A geneBOX - R&D Diagnostic Tests não se responsabiliza por qualquer dano causado pela manipulação inapropriada ou pelo contacto com os referidos produtos.

Controlo de Qualidade

Foram usadas amostras de DNA de 3 linhas celulares constantes do *SSOP Panel* do *13th International Histocompatibility Workshop* para verificar a especificidade das misturas de primers deste kit.

Nome do Workshop	Designação
IHW 09273	LADA
IHW 09052	DBB
IHW 09398	FH18

Não foram registados Falsos positivos ou falsos negativos.

O controlo negativo pode detectar contaminação cruzada com produtos de PCR.

Validação - Linhas Celulares

Kit de tipagem por PCR-SSP HLA-B*57 plus					
Linha celular		Tipagem celular			Poços positivos
		HLA-A*	HLA-B*	HLA-Cw*	
9273	LADA	0202:8001	0702; 5703	0701; 0802	1a, 1b, 1c, 1e, 1g
9052	DBB	020101:	5701	0602	1a, 1b, 1c, 1d, 1g
9398	FH18	7401;3601	5301;5703	0401;0701	1a, 1b, 1c, 1e, 1g

Para mais esclarecimentos, por favor contactem com o apoio técnico para o
+351 231 410 946

Componentes do HLA-B57 plus Typing Kit

- **Placas de tipagem de HLA- B 57⁺** (48 tipagens)
16 Placas (3 amostras cada) (conservar de -15 °C a -30 °C)
- **Mistura de reacção (com Taq Polimerase)**
16 X 80 µl (conservar de -15°C a -30°C)
- **Selantes de Placas**
48 Cápsulas selantes
- **Manual de instruções**
1 Manual de Instruções

* com pares de primers específicos desidratados (6 pares de primers específicos; um controlo positivo e 1 controlo negativo por amostra).

Componentes da PCR Master Mix

Nucleótidos:

concentração final de cada dNTP é 600 µM

Tampão da PCR:

concentrações finais são 3,3x NH₄, 2,0 mM MgCl₂ e 0,4 u/µl Taq DNA polimerase, pH 8.3.

Glicerol:

concentração final é 16,6%

Vermelho de cresol:

concentração final é de 300µg/ml

Folha de Dados de Segurança (2/3) Material Safety Data Sheet (MSDS)

6. Protecção pessoal.

Protecção das mãos: use luvas apropriadas, resistentes a químicos.

Protecção dos olhos: recomenda-se o uso de óculos de protecção química.

7. Manipulação e armazenamento

Manipulação: evite o contacto directo com a substância.

Armazenamento: armazene à temperatura aconselhada, proteja do contacto com a luz.

Danificação da embalagem protectora: rejeitar o constituinte contido na embalagem.

8. Perigos

Os componentes da mistura de reacção podem ser perigosos se inalados, ingeridos ou absorvidos pela pele. Este material pode causar irritação da pele, dos olhos e do tracto respiratório. A ingestão de grandes quantidades desta mistura pode causar dores de estômago, vómitos ou diarreia.

9. Medidas de Primeiros Socorros

No caso de **contacto com os olhos**, deve lavar imediatamente os olhos com água abundante por cerca de 15 minutos. Deve consultar o seu médico.

No caso de **contacto com a pele**, deve lavar imediatamente a zona afectada com água corrente e sabão. Lave a roupa contaminada antes da sua utilização.

No caso de **ingestão**, lave a boca com água abundante. Deve contactar o seu médico se necessário.

No caso de **inalação**, mudar a vítima para um local arejado. Se se encontrar inanimado aplique respiração artificial. Se apresentar dificuldades respiratórias aplique oxigénio. Deve consultar o seu médico.

10. Medidas a tomar em caso de incêndio

Meios de extinção: Água, dióxido de carbono, pó químico seco ou espuma apropriada.

Meios de extinção não aconselhados: não existem restrições conhecidas.

Perigos específicos de exposição: em caso de incêndio podem emitir fumos tóxicos de dióxido e monóxido de carbono, nitrogénio, fósforo, cloreto de hidrogénio, e gás hidrogénio.

Equipamento especial de combate ao incêndio: quando são libertadas grandes quantidades de substância trabalhe apenas com protecção adequada para olhos e pele.

11. Medidas a tomar no caso de derrame acidental

Precauções pessoais: evite o contacto directo com a substância.

Limpeza: limpe normalmente a área afectada, não são necessários cuidados adicionais.

Protecção da pele: use uma bata de laboratório.

Folha de Dados de Segurança (1/3) Material Safety Data Sheet (MSDS)

Produtos de tipagem SSP da geneBOX™

Esta folha de dados de segurança é aplicável a todos os produtos de tipagem por PCR-SSP da geneBOX™.

1. Produtos Químicos e Identificação da Companhia

Data de realização: Maio 2010
Grupo do produto: Produtos de tipagem SSP da geneBOX™
Manufacturação: geneBOX - R&D Diagnostic Tests,
biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede, portugal
tel/fax: +351 231 410 946/ +351 231 410 947
e-mail: info@genebox.com

2. Composição e Informação sobre os reagentes

Componente	Químico	Nome vulgar
Placa	Ácido Desoxiribonucleico Vermelho de Cresol	Oligonucleótido
Mistura de reacção	Desoxiribonucleótidos Tampão NH ₄ Cloreto de Magnésio Vermelho de Cresol Glicerol Taq DNA Polimerase	Nucleótidos MgCl ₂ Taq

3. Propriedades físico-químicas:

Componente	Aspecto	Cor	Odor
Placa	seco, no fundo do poço	vermelho	nenhum
Mistura de reacção	líquido	vermelho/rosa	nenhum

4. Informação Toxicológica

Químico	Toxicidade
Glicerol	LD50= oral 4090 mg/kg (ratinho) LD50= oral 12600 mg/kg (rato) LD50= oral 1480 mg/kg (humano)

5. Estabilidade e reactividade

Condições a evitar: Calor e humidade.

Incompatibilidades: Bases e agentes oxidantes fortes.

Protocolo de amplificação por PCR

Reagentes

- Amostra de DNA (100-200 ng/μl)
- PCR Master Mix
- Água bi-destilada estéril (não fornecida)

Extracção de DNA

Para a tipagem por SSP é necessário DNA extra puro. Recomenda-se que o isolamento de DNA seja efectuado utilizando kits de extracção com marcação CE, que garantam um rácio DO 260/280 maior do que 1.6 e uma concentração entre 100ng – 200 ng/μl.

Alternativamente, o DNA pode ser extraído utilizando sais de Brometo de Trimetilamonía (DTAB/CTAB) ou por *salting out*, dissolvendo-o em Tampão TE. Devem ser asseguradas o mesmo nível de DO e de concentração.

NÃO UTILIZE SANGUE HEPARINIZADO COM ESTE MÉTODO

Amplificação por PCR

1. Agite brevemente os tubos de DNA e da mistura de reacção.
2. Junte:
 - **25 μl da PCR Master Mix,**
 - **50 μl de dd H₂O**num tubo de 0,7 ml ou 1,5 ml.
3. Agite vigorosamente durante 15s.
4. Pipete **10 μl** da mistura para o controlo negativo.
5. Adicione á mistura de reacção, **7 μl da amostra de DNA** (conc. 100-200 ng / μl).
6. Agite vigorosamente durante 15s.
7. Pipete **10 μl** da mistura para cada um dos restantes 7 poços.
8. Repita os passos anteriores para as restantes amostras de DNA para completar a placa de tipagem.
9. Sele a placa de tipagem com as respectivas tampas e ponha-a num termociclador de 96 poços.

Parâmetros do programa PCR

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Denaturação	96 °C	1 min	1
Denaturação	96 °C	25 seg	5
Emparelhamento	70 °C	45 seg	
Extensão	72 °C	30 seg	
Denaturação	96 °C	25 seg	21
Emparelhamento	65 °C	45 seg	
Extensão	72 °C	30 seg	
Denaturação	96 °C	25 seg	4
Emparelhamento	55 °C	1 min	
Extensão	72 °C	2 min	
Extensão	72 °C	10 min	1
Guardar (opcional)	4 °C	25 seg	1

10. No final da PCR guarde a placa a 2-8 °C.
11. Detecte os produtos do PCR com uma electroforese em gel de agarose a 2%.
12. Use a **Tabela de interpretação de resultados** para interpretar os resultados.

Declaração de Conformidade

Nome do Produto: HLA-B 57 plus

Numero do Produto: GB.03.05

Utilização: HLA-B*57 teste de alelos e associação a doença.

Produção: geneBOX - R&D Diagnostic Tests,
biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede, portugal

Nós, geneBOX - investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico, indubitavelmente declaramos que este produto, ao qual se relaciona esta declaração de conformidade, está em conformidade com os seguintes documentos normativos, ISO 9001:2008 e ISO 13485:2004. Seguindo ainda, as indicações da Directiva Europeia 98/79/CE sobre dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*, Anexo II lista B, conformidade de acordo com o Anexo IV, transposto para as leis nacionais dos estados membros da União Europeia.

A ficha e os documentos técnicos deste produto são mantidos na geneBOX, biocant, centro de inovação em biotecnologia, 3060-197 Cantanhede, Portugal.

Organismo Notificador: TÜV Rheinland Product Safety GmbH, TÜV Rheinland Group, Am Grauen Stein 51105 Köln/Cologne - Germany (Organismo notificador número: 0197)



Sandra Balseiro
Directora Técnica

Aviso de garantia

geneBOX –investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos responsabiliza-se, perante os seus clientes, pelos defeitos no material e componentes dos seus produtos aplicados em condições normais. Os produtos da empresa que apresentam esta garantia devem ser substituídos, sem encargos para o cliente.

Esta garantia aplica-se só para produtos que sejam manipulados e armazenados de acordo com as especificações e recomendações de utilização.

As reclamações devem ser enviadas, por escrito, directamente para a geneBOX e devem ser acompanhadas por uma cópia da guia de transporte ou factura do produto.

Este produto não pode ser reformulado, reembalado ou revendido em nenhuma forma sem o expreso consentimento da geneBOX - investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos.

Protocolo de electroforese em gel de agarose

Preparação do gel de agarose a 2%

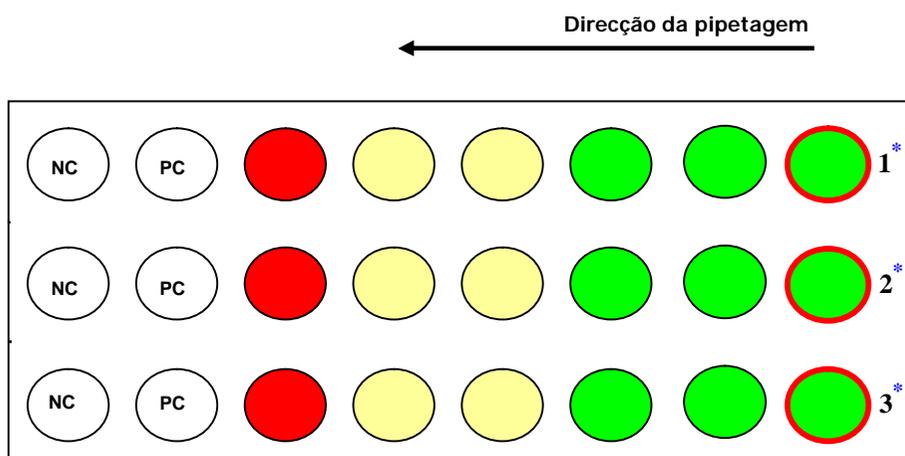
1. Dissolver **4 gramas** de pó **agarose** em **200 ml** de tampão **TAE 1X**.
2. Dissolver completamente a agarose aquecendo-a no microondas.
3. Arrefeça o gel até, aproximadamente, 50°C.
4. Adicione pelo menos **20 µl de brometo de etídio⁺⁺** (10 mg/ml) **ou de Sybr Safe** (10000x concentrado à agarose). Agite até estar completamente incorporado.
5. Numa superfície nivelada, monte a placa do gel com 96 poços.
6. Verta uma camada de gel com cerca de **5mm**.
7. Deixe o gel arrefecer.

⁺⁺ Atenção este reagente é um forte agente mutagénico (leia atentamente a MSDS do produto).

Electroforese

1. Submirja o gel na tina de electroforese com tampão TAE 1X.
2. Remova os pentes com cuidado do gel.
3. Adicione **10 µl** do **produto de PCR** em cada poço.
4. Ligue a tina de electroforese à corrente com uma voltagem média (**115V**).
5. Deixe a electroforese correr por cerca de 20 minutos, ou até o corante estar a 2/3 da linha.
6. Ponha o gel no transiluminador.
7. Fotografe o gel e identifique-o.
8. Use a **Folha de interpretação de resultados** para interpretar os resultados.

Esquema da tira HLA-B 57 plus 1.0



* A numeração pode diferir de placa para placa:

O n.º 1 pode ser 4, 7, 10

O n.º 2 pode ser 5, 8, 11

O n.º 3 pode ser 6, 9, 12

Identificação da Placa HLA-B*57 Plus Box 1.0

Posição	HLA-B*57
1a	5701-14
1b	5701-14 except 5708; 5710; 5712
1c	5701-14 except 5705; 5706; 5711
1d	5701; 5706; 5708; 5710; 5711; 5714
1e	5703 and 5707
1f	5714
1g	Controlo positivo
1h	Controlo negativo

Garantia

geneBOX – investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos garante que os primers presentes no kit de tipagem HLA-B 57 plus apresentam as especificidades dadas nas folhas e tabelas de interpretação de resultados do produto.

1. Placa de Tipagem

Armazenamento a -20°C , os primers desidratados permanecem estáveis durante 12 a 19 meses a partir da data de produção (ver validade do lote na embalagem).

Armazenamento a 4°C , os primers desidratados permanecem estáveis durante 12 meses a partir da data de produção.

À temperatura ambiente, os primers desidratados permanecem estáveis durante 3 a 4 semanas a partir da data de recepção.

Quando o selante é removido os primers desidratados permanecem estáveis durante 2 dias, no máximo, desde que não humedecem.

2. Mistura de Reacção

Armazenamento a -20°C , a mistura de reacção permanece estável durante 18 meses a partir da data de produção (ver validade do lote na embalagem).

Armazenamento a 4°C , a mistura de reacção permanece estável durante 15 dias a partir da data de recepção.

À temperatura ambiente, a mistura de reacção permanece estável durante 3 dias a partir da data de «recepção».

A mistura de reacção nunca deve ser deixada ou armazenada com a tampa aberta.

3. DNA

O DNA extraído por *salting out* ou por qualquer outro método deve ser armazenado a 4°C ou -20°C . Ao optar pela congelação das amostras, devem ser evitadas ciclos repetidos de congelação/descongelação, de modo a impedir a degradação da amostra.

As amostras de DNA armazenadas em dH_2O permanecem estáveis durante, pelo menos, 4 semanas (a 4°C) ou 2 anos (a -20°C).

As amostras de DNA armazenadas em tampão TE permanecem estáveis durante, pelo menos, 2 anos (a 4°C) ou 5 anos (a -20°C).

Guia Técnico

1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o HLA-B 57 plus 1.0 Typing Kit™ a pureza da amostra de DNA é crítica. Ter uma amostra pura significa obter uma razão 260nm/280nm de DO superior a 1.6 e uma porção de DNA superior a 9.4 kb. A elevada degradação do DNA ou uma razão 260nm/280nm inferior a 1.5 requer uma nova extracção de DNA.

Cada amostra de DNA deve ter aproximadamente 100 a 200 ng/μl. Concentrações elevadas de DNA provocam um declínio considerável na especificidade da PCR.

Recomenda-se o uso de qualquer kit de extracção de DNA que apresente marcação CE, de modo a obter um DNA extra puro.

2. Taq Polimerase

O HLA-B 57 plus 1.0 Typing Kit™ foi intensivamente testado utilizando a Taq da Reagente 5 (Reagente 5, Lisboa, Portugal).

3. Mistura de reacção

Para uma boa performance da tipagem com o HLA-B 57 plus 1.0 Typing Kit™ é obrigatória a utilização da PCR Master Mix fornecida com o Kit.

4. Procedimentos de amplificação

No fim da PCR, examine o grau de evaporação e de condensação da mistura de reacção da PCR. Se as perdas de volume forem superiores a 20% não devem ser validados os resultados obtidos. De forma a prevenir esta situação devem adicionar previamente óleo mineral à mistura de reacção ou utilizar um adaptador de silicone para placas de 96. Também se deve ter em atenção a temperatura de aquecimento do aparelho. Se a temperatura de aquecimento não for suficiente vão se verificar problemas de condensação.

5. Termociclador

Recomenda-se utilização de qualquer Termociclador que apresente as seguintes características:

- "heating rate" superior a 2.5°C/sec; "cooling rate" superior a 1.5°C/sec;
- gama de temperaturas 4-100°C; uniformidade de temperaturas ±0.5°C;
- "heated lid" superior a 100°C.

6. Validade

Como especificado na embalagem

Se os problemas persistirem, por favor contactem com o apoio técnico para o +351 231 410 946

Folha de interpretação de Resultados

Posição			HLA-B 57	Banda específica	Banda Controlo**
1a	2a	3a	5701-14	380	790
1b	2b	3b	5701-14 excepto 5708; 5710; 5712	225	790
1c	2c	3c	5701-14 except 5705; 5706; 5711	165	790
1d	2d	3d	5701; 5706; 5708; 5710; 5711; 5714	165	790
1e	2e	2e	5703 e 5707	155	790
1f	2f	2f	5714	185	790
1g	2g	2g	Controlo Positivo	790	-
1h	2h	2h	Controlo negativo	-	-
DNA 1	DNA 2	DNA 3			

**Control primer pairs match with non-allelic sequences. The internal positive control primer pairs amplify segments of the HLA-DRB1 gene, giving rise to 1600 base pair fragments and 796 base pair fragment.

In the presence of the specific band amplification the control band intensity often decreases.

The PCR reaction is only valid in the presence of control band or, in some cases, in the presence of the specific band.

In the absence of the control band, please repeat the typing.

Tabela de Interpretação de resultados

Poço nº	1a	1b	1c	1d	1e	1f
Associated with disease Treatment and clinical symptoms (HLA-B*5701) ⁵⁻¹⁴	+	+	+	+		
No association (HLA-B*5706; 5711) ⁵⁻¹⁴	+		+	+		
No association (HLA-B*5708; 5710) ⁵⁻¹⁴	+	+		+		
No association (HLA-B*5714) ⁵⁻¹⁴	+	+	+	+		+
Association in Africans, No association in Caucasoid (HLA-B*5703) ^{14, 15}	+	+	+		+	
HLA-B57 NEGATIVO		+		+		
				+		
					+	

Guia de resolução de problemas

PROBLEMAS	POSSIVEIS CAUSAS	SUGESTÕES	
Bandas controlo e específicas fracas	Concentração da amostra de DNA baixa	Verifique a qualidade e concentração do DNA	
		Reextraia a amostra de DNA ou tente não adicionar água à mistura de reacção	
		Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade	
	Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA	Repurifique a amostra de DNA Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade	
Os controlos internos falharam em diversos poços	Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA	Repurifique a amostra de DNA Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade	
		Verifique a selagem das placas Repita a tipagem utilizando um adaptador de silicone para placas de 96 e/ou adicione óleo mineral.	
	Produtos de amplificação secos	Reextraia a amostra de DNA de material fresco Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade	
Falsos negativos de uma banda específica com o controlo interno normal	Degradação da amostra de DNA	Reextraia a amostra de DNA de material fresco Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade	
Deteção de mais de dois alelos específicos	Amostra de DNA muito concentrada	Verifique a qualidade e concentração do DNA Dissolva o DNA em d_0H_2O de forma a obter a concentração exacta Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade	
		Contaminação com outros produtos de PCR ou outras amostras de DNA durante a preparação do PCR	Limpe a zona de trabalho Trabalhe em zonas Pré e Pós-PCR separadas Utilize batas distintas para a zona Pré e Pós-PCR Mude de luvas frequentemente Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
	Esfregaço de bandas	Degradação da amostra de DNA	Reextraia a amostra de DNA de material fresco Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
			Amostra de DNA muito concentrada
Problemas com tampão de electroforese: Fora de prazo ou composição errada		Use um tampão recomendado novo	

Avisos e precauções

A amplificação por PCR permite-nos obter milhões de cópias de DNA a partir de uma pequena quantidade de amostra. Infelizmente isto também é verdade para o DNA contaminante, que pode comprometer performance da nossa reacção. Consequentemente, práticas laboratoriais específicas podem evitar a presença de amplificações inespecíficas. Em baixo encontram-se descritas as recomendações da Genebox:

- Separe fisicamente as áreas de pré-PCR e de pós-PCR.
- O fluxo Laboratorial deve ser sempre unidireccional da área pré-PCR para a área pós-PCR.
- Deve sempre utilizar-se equipamentos específicos para cada area de trabalho (preparação de amostras; pré-amplificação amplificação e pós-amplificação).
- Todos os equipamentos utilizados na área de pós-PCR não devem sair desta zona.
- Utilize micropipetas, luvas e batas específicas para cada área.
- Utilize preferencialmente luvas sem talco (uma vez que o talco pode inibir a reacção de PCR).
- Utilize pontas de filtro de forma a minimizar contaminações cruzadas.
- Verifique periodicamente as micropipetas de forma a assegurar a variação de pipetagem inferior a 5%.
- Utilize micropipetas adaptadas a cada volume de pipetagem.
- Verifique periodicamente os termocicladores, de forma a assegurar a variação de temperaturas inferiores a 1%.
- Abra e feche os reagentes com cuidado. Depois de utilizar armazene os restantes componentes do kit às temperaturas recomendadas devidamente fechados.
- Não utilize o kit com a validade expirada.
- Os componentes dos kits são resistentes às temperaturas de armazenamento indicadas. O armazenamento dos kits a temperaturas não recomendadas podem levar à rupturas no material e contaminação dos reagentes dos kits.
- Os materiais plásticos fornecidos neste kit são resistentes à gama de temperaturas de utilização e armazenamento recomendadas. A sua utilização em gamas distintas de temperaturas pode causar rupturas impossibilitando a utilização normal do kit.
- Verifique a concentração e qualidade de todas as amostras de DNA antes de utilizar este kit.

Instruções de gerais de segurança no laboratório:

- Não coma, beba ou fume dentro do laboratório.
- Utilize sempre luvas descartáveis e mude-as com frequência.
- Utilize batas limpas e proteja os olhos (sempre que se justifique).
- Lave as mãos antes e depois de qualquer manipulação de amostras ou reagentes.
- Lave a área de trabalho antes e depois de qualquer manipulação.
- Não pipete com a boca.