Código do Produto: 10.06

HLA-B 27 Single Box 1.0

Typing Kit

Dispositivo para utilização *in vitro*

Manual de Instruções

CE 0197

geneBOX
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

geneBOX
DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

Versão1.6; Junho de 2011.

CE 0197

genebox
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

genebox
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

CE 0197

genebox
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*27 Single 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*27 Single 1.0..... 10
Identificação da placa HLA-B*27 Single 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

O HLA-B*27 tem vindo a ser associado a várias doenças inflamatórias e autoimunes, destacando-se a artrite reumatóide, a espondilite anquilosante, o sindroma de Bechterew, o sindroma de Reiter, a espondílose, uveítes, etc. Contudo, nem todos os subtipos do HLA-B*27 estão directamente associados a estas doenças.

Este kit contém placas com misturas de primers desidratadas e PCR Master Mix para efectuar a identificação do alelo HLA-B 27.

Alterações e melhoramento do Produto

O kit HLA-B*27 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. Hulsemann JL, Zeidler H. Undifferentiated arthritis in an early synovitis out-patient clinic. *Clin Exp Rheumatol*. 1995; 13: 37-43.

2. Kim YA, Bagley MP, Thomas I. Incomplete Reiter's syndrome in a black patient showing HLA B 27. *Cutis*. 1991; 47: 253-254.

3. Schilling F, Stollenwerk R, Dreher R. Traditional and new types of spondarthritis with special consideration of spondylodiscitis. Neurosurg Rev. 1990;13: 273-278.

4. Sampaio-Barros PD, Conde RA, Donadi EA, Kraemer MH, Persoli L, Coimbra IB, Costallat LT, Samara AM, Bertolo MB. Undifferentiated spondyloarthropathies in Brazilians: importance of HLA-B27 and the B7-CREG alleles in characterization and disease progression. *J Rheumatol*. 2003; 30: 2632-2637.

5. Voorter CE, Swelsen WT, van den Berg-Loonen EM. B*27 in molecular diagnostics: impact of new alleles and polymorphism outside exons 2 and 3. *Tissue Antigens*. 2002; 60: 25-35.

6. Orchard TR, Chua CN, Ahmad T, Cheng H, Welsh KI, Jewell DP. Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: clinical features and the role of HLA genes. *Gastroenterology*. 2002;123: 714-718.

7. Tamouza R, Mansour I, Bouguacha N, Klayme S, Djouadi K, Laoussadi S, Azoury M, Dulphy N, Ramasawmy R, Krishnamoorthy R, Toubert A, Naman R, Charron D. A new HLA-B*27 allele (B*2719) identified in a Lebanese patient affected with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens*. 2001; 58: 30-33.

8. Orchard TR, Thiyagaraja S, Welsh KI, Wordsworth BP, Hill Gaston JS, Jewell DP. Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000; 118: 274-278.

9. Hemmatpour SK, Dunn PP, Evans PR, Green A, Howell WM. Functional characterization and exon 2-intron 2-exon 3 gene sequence of HLA-B*2712 as found in a British family. *Eur J Immunogenet*. 1998; 25: 395-402.

10. Fraile A, Martin J, Lopez-Nevot MA, Mataran L, Nieto A. HLA-B*27 subtyping by PCR-RFLP in Spanish patients with ankylosing spondylitis. Tissue Antigens. 1998; 52: 492-496.

11. Oguz FS, Ocal L, Diler AS, Ozkul H, Asicioglu F, Kasapoglu E, Bozkurt G, Konice M, Carin M. HLA B-27 subtypes in Turkish patients with spondyloarthropathy and healthy controls. *Dis Markers*. 2004; 20: 309-312.

12. Weissensteiner T, Lanchbury JS.An integrated multiplex-PCR and PCR-RFLP typing system for markers associated with seronegative arthritides. *Hum Immunol*. 1998; 59: 119-132.

13. 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

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 a seguradas as temperaturas, não devendo ultrapassar os 25ºC. 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.

Para mais esclarecimentos, por favor contactem com o apoio técnico para o

+351 231 410 946

Controlo de Qualidade

Foram usadas amostras de DNA de 4 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 09266	PAR
IHW 09376	FH4
IHW 09377	FH5
IHW 09380	FH6

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*27 Single					
Linha celular		Tipagem celular			Poços positivos
		HLA-A*	HLA-B*	HLA-Cw*	
9380	**FH6**	2402;2901	**2702;0705/6**	02022;1505	**Todos**
9376	**FH4**	0101	**2703;2705**	02022	**Todos**
9266	**PAR**	11011;2402	**2706;4801**	03041;0801	**Todos**
9377	**FH5**	2902;0201	**2709;4403**	0102;1601	**Todos**

Componentes do HLA-B27 Single Box Typing Kit

- **Placas de tipagem de HLA- B 27⁺** (88 tipagens)

  4 Placas (22 amostras cada) (conservar de -15 a -30ºC)

- **Mistura de reacção (com Taq Polimerase)**

  4 X 80 µl (conservar de -15 a -30ºC)

- **Selantes de Placas**

  12 cápsulas selantes

- **Manual de instruções**

  1 Manual de Instruções

⁺ com pares de primers específicos desidratados (22 pares de primers específicos; 1 controlo positivo e 1 controlo negativo por placa).

Componentes da PCR Master Mix

Nucleótidos:
concentração final de cada dNTP é 600 µM

Tampão da PCR:
concentrações finais são 3,3x NH_4, 2,0 mM $MgCl_2$ 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)

geneBOX - R&D Diagnostic Tests™ PCR-SSP Kits

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:	Junho 2011
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	Acido Desoxiribonucleico	Oligonucleótido
	Vermelho de Cresol	
Mistura de reacção	Desoxiribonucleótidos	Nucleótidos
	Tampão NH_4	
	Cloreto de Magnésio	MgCl2
	Vermelho de Cresol	
	Glicerol	
	Taq DNA Polimerase	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 Trimetilamonia (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.

   Junte:

   80 µl da PCR Master Mix e

   160 µl de água bi-destilada estéril

   num tubo de 1,5 ml.
2. Agite vigorosamente durante 15 segundos.
3. Pipete **9 µl** da mistura para cada poço da placa de tipagem.
4. Pipete **1 µ da amostra de DNA (conc. 100-200 ng/µl)** em cada poço (excepto no controlo positivo e negativo).
5. Repita os passos anteriores para cada uma das amostras DNA (num total de 22 amostras por placa).
6. Sele a placa de tipagem com as cápsulas selantes e coloque num aparelho PCR de 96 poços.

Parâmetros do programa PCR

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

7. No final da PCR guarde a placa a 2-8 ºC.
8. Detecte os produtos do PCR com uma electroforese em gel de agarose a 2%.
9. Use a ***Tabela de interpretação de resultados*** para interpretar os resultados.

Declaração de Conformidade

Nome do Produto: HLA-B*27 Single Box

Numero do Produto: GB.10.06

Utilização: Detecção do alelo HLA-B*27.

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 expresso consentimento da geneBOX - investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos.

Protocolo de electroforese em gel de agarose

Preparação do gel de agarose a 2 %

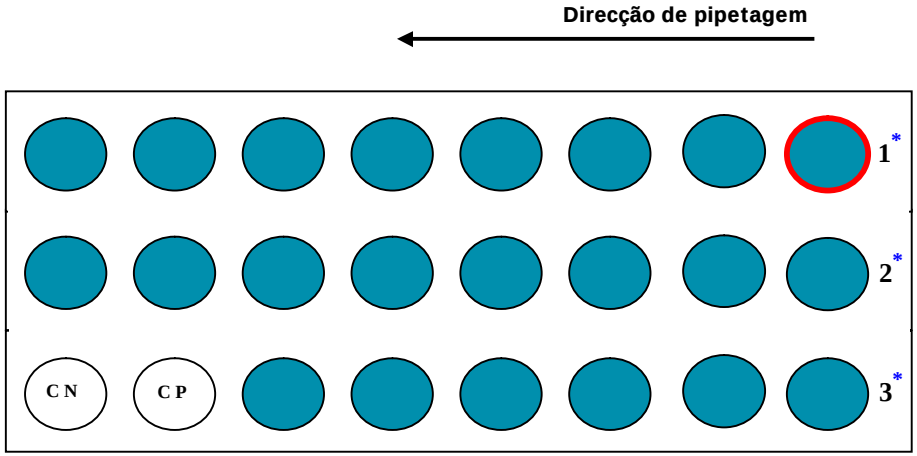
1. Dissolver **4 gramas** de pó **agarose** em **200 ml** de tampão **TAE 1X**.
2. Dissolver completamente a agarose aquecendo-a no microondas.
3. Arrefeça o gel até, aproximadamente, 50ºC.
4. Adicione pelo menos **20 µl de brometo de etídio**$^{++}$ (10 mg/ml) **ou de Sybr Safe** (10000x concentrado 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 placa HLA-B 27 Single Box 1.0



* A numeração pode variar de placa para placa sendo:
o nº 1 equivalente a 4, 7, 10
o nº 2 equivalente a 5, 8, 11
o nº 3 equivalente a 6, 9, 12

Identificação da placa HLA-B 27 Single Box 1.0

Posição	Produto
Linhas 1, 2 e 3 (excepto controlos)	B*2701-2743
CP	Controlo Positivo
CN	Controlo negativo

Garantia

geneBOX – investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos garante que os primers presentes no kit de tipagem HLA-B*27 single apresentam as especificidades dadas nas folhas e tabelas de interpretação de resultados do produto.

1. Placa de Tipagem

Armazenamento a -20ºC, os primers desidratados permanecem estáveis durante 12 a 19 meses a partir da data de produção (ver validade do lote na embalagem).
Armazenamento a 4ºC, 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 humedeçam.

2. Mistura de Reacção

Armazenamento a -20ºC, a mistura de reacção permanece estável durante 18 meses a partir da data de produção (ver validade do lote na embalagem).
Armazenamento a 4ºC, 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 4ºC ou -20ºC. 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 4ºC) ou 2 anos (a -20ºC).
As amostras de DNA armazenadas em tampão TE permanecem estáveis durante, pelo menos, 2 anos (a 4ºC) ou 5 anos (a -20ºC).

Guia Técnico

1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o HLA-B 27 Single 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 27 Single 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 27 Single 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 2.5ºC/sec; “cooling rate” superior a 1.5ºC/sec; gama de temperaturas 4-100ºC; uniformidade de temperaturas ±0.5ºC; “heated lid” superior a 100ºC.

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 27	Banda especifica	Banda Controlo**
Linhas 1,2 e 3 (excepto controlos)	B*27 positivo	150	790 pb
	B*27 negativo	----	790 pb
CP	Controlo Positivo	150	----
CN	Controlo Negativo	----	----

****Os pares de primers controlo emparelham com sequências não polimórficas. Os primers de controlo positivo interno amplificam segmentos do gene HLA-DRB1, originando fragmentos com 790 pares de bases.**
Na presença da banda específica a banda controlo pode ver diminuída a sua intensidade.
A reacção de PCR só é valida na presença da banda controlo ou, nalguns casos, na presença da banda específica.
Na ausência da banda controlo, por favor, repita a tipagem.

NOTA: Se o PCR tiver bandas com tamanhos diferentes dos previstos não as considere pois pode tratar-se de bandas não específicas ou artefactos.

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
	Produtos de amplificação secos	Verifique a selagem das placas
		Repita a tipagem utilizando um adaptador de silicone para placas de 96 e/ou adicione óleo mineral.
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
Detecção de mais de dois alelos específicos	Amostra de DNA muito concentrada	Verifique a qualidade e concentração do DNA
		Dissolva o DNA em $_{dd}$H2O 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	Verifique a qualidade e concentração do DNA
		Dissolva o DNA em $_{dd}$H2O de forma a obter a concentração exacta
		Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
	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 descriminadas 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 sais 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.