

HLA-B single Box 1.0 Typing Kit

Dispositivo para utilização *in vitro*

Manual de Instruções



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

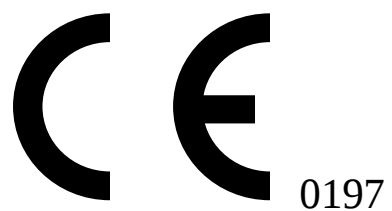
biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede
portugal

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

Versão 1.6; Maio de 2010.



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

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.



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.....	6
Componentes do HLA-B single 1.0 Typing Kit.....	7
Protocolo de amplificação por PCR.....	8
Reagentes.....	8
Extracção de DNA.....	8
Amplificação por PCR	8
Parâmetros do programa de PCR.....	9
Protocolo de electroforese em gel de agarose.....	10
Preparação do gel a 2%.....	10
Electroforese.....	10
Esquema da placa HLA-B single 1.0	11
Identificação da placa HLA-B single 1.0	12
Folha de interpretação dos Resultados.....	13
Tabela de interpretação dos Resultados	15
Guia de resolução de problemas	17
Avisos e precauções.....	18
Guia técnico.....	19
Garantia.....	20
Aviso de Garantia.....	21
Declaração de Conformidade	22
Folha de dados de segurança.....	23
Referências.....	26

Apresentação

Este kit contém placas com misturas de primers desidratadas e PCR Master Mix para efectuar a tipagem genética de baixa resolução dos genes de HLA-B.

Alterações e melhoramento do Produto

O kit HLA-B single está constantemente a ser actualizado, ao nível da sua especificidade e interpretação, de modo a incluir novos alelos que venham a ser descritos. 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		

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 seguras 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.

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

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, vômitos 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 accidental

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.

Controlo de Qualidade

Foram usadas amostras de DNA de 52 linhas celulares constantes do *IHWG Sequence Polymorphism Reference DNA SSOP Panel* para verificar a especificidade das misturas de primers.

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 SSP HLA-ABC baixa resolução			
Linha celular		Tipagem celular	HLA-B
		HLA-B*	Nº dos poços positivos
9215	M7	3501;5301	27/28/29/41/42
9273	LADA	0702;5703	5/13/18/41/42
9263	G085	4006;5201	1/2/4/31/41/42
9373	FH1	1402;5801	11/19/41/42
9030	JHAF	51011	1/2/3/41
9035	JBush	3801	15/41
9045	TUBO	51011	1/2/3/41
9220	XLI-ND	1302;4006	10/31/41/42
9077	T7527	4601	13/36/42
9085	EJ32B	1801	21/42
9103	KT14	4006;51011	1/2/3/31/41/42
9374	FH2	4001;4402	7/8/31/32/33/41/42
9375	FH3	1402;3502	11/27/28/29/42
9364	GRC202	3505;4004	27/29/31/42
9371	ISH4	1501;4601	12/13/36/42
9368	280599	3901;3802	15/16/41/42
9367	LCK	38021;4601	13/15/36/41/42
9394	BPOT	0703;15	5/12/13/42
9048	LBUF	1302	10/41
9032	BSM	1501	12/13/42
9237	APA	1502;5502	13/24/42
9253	THA1742	1512;4601	12/13/36/42
9369	ISH3	1526N	12/13/42
9380	FH6	2702;0705/6	5/26/41/42
9376	FH4	2703;2705	26/41
9266	PAR	2706;4801	26/33/41/42
9377	FH5	2708;4403	7/8/26/41
9068	BM9	3501	27/28/29/42
9056	K0SE	3503	27/28/29/42
9009	KAS011	3701	30/41
9381	FH7	3908;1801	16/21/42
9385	FH11	4404;07021	5/7/8/41
9047	PLH	4701	37/41
9392	GN00218	4703	37/41
9040	BM15	4901	23/41
9092	BM92	51011	1/2/3/41
9370	230699	5103;07021	1/2/3/15/41/42
9372	ISH5	5401;4801	24/33/38/42
9052	DBB	5701	18/41
9267	LE023	7301;51011	1/2/3/39/42
9382	FH8	8201;27052	24/26/41/42
9366	Daudi	5801;5802	19/41
9014	MGAR	0801	6/42
9053	HOR	44031	7/8/41
9021	RSH	4201	35/42
9024	KT17	15011;3501	12/13/27/28/29/42
9016	RML	51011	1/2/3/41
9297	HAG	4102	33/42
9386	FH12	4402;27052	7/8/26/41
9387	FH13	44031;1501	7/8/12/13/41/42
9398	FH18	5301;5703	20/18/28/41

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:	Maio 2010
Grupo do produto:	Produtos de tipagem SSP da geneBOX™
Manufaturação:	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

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.

Declaração de Conformidade

Nome do Produto: HLA-B

Numero do Produto: GB.13.06

Utilização: Tipagem de baixa resolução das moléculas de HLA-B.

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

Componentes do HLA-B single Box Typing Kit

- **Placas de tipagem de baixa resolução de HLA- B⁺ (24 tipagens)**
12 placas (2 amostras cada) (conservar de -15 a -30 °C)
- **Mistura de reacção (com Taq Polimerase)**
12 X 310 µl (conservar de -15 a -30°C)
- **Selantes de Placas**
12 selantes para PCR transparentes
- **Manual de instruções**
1 Manual de Instruções

+ com pares de primers específicos desidratados (42 pares de primers e 6 controlos negativos).

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 Amplitaq DNA polimerase, pH 8.3.

Glicerol:

concentração final é 16,6%

Vermelho de cresol:

concentração final é de 300µg/ml

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 Trimetilamonio (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:
 - **153 μl da PCR Master Mix,**
 - **308 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 poço do controlo negativo.
5. Adicione á mistura de reacção, **40 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 43 poços.
8. Repita os passos anteriores para uma segunda amostra DNA, de modo a completar a placa de tipagem HLA-B.

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.

Garantia

geneBOX – investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos garante que os primers presentes no kit de tipagem HLA-B single 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 dH₂O 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).

- Selecione a placa de tipagem com um autocolante e ponha-a num termociclador de 96 poços.

Parâmetros do programa PCR

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

- No final da PCR guarde a placa a 2-8 °C.
- Detecte os produtos do PCR com uma electroforese em gel de agarose a 2%.

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 minutes, 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 **Tabela de interpretação de resultados (1-4)** para interpretar os resultados.

Guia Técnico

1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o HLA-B 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 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 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 2.5°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**

Avisos e precauções

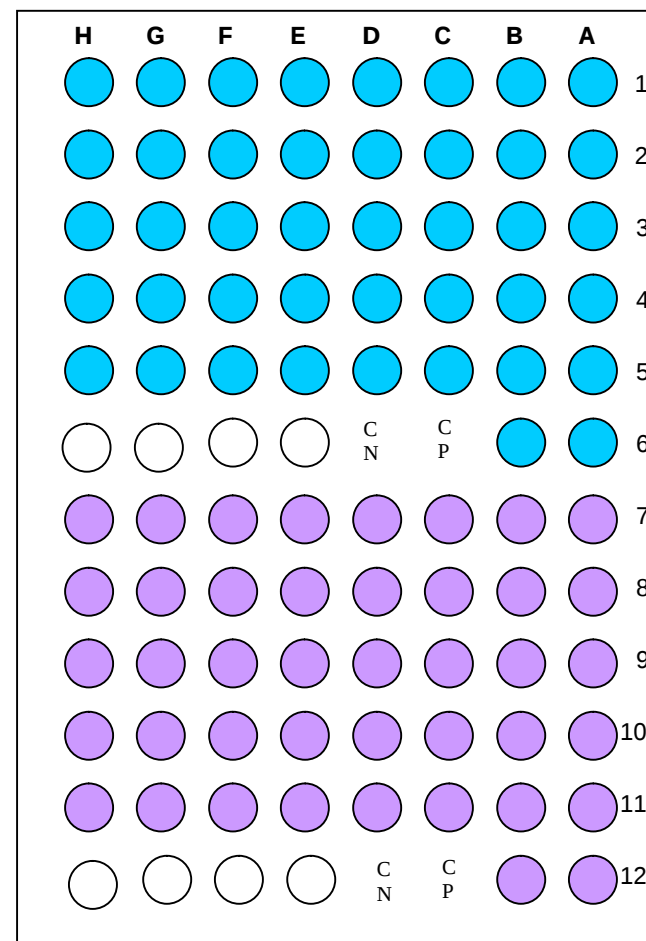
A amplificação por PCR permite-nos obter milhões de cópias de DNA a partir de uma pequena quantidade de amostra. Infelizmente isto também é verdade para o DNA contaminante, que pode comprometer performance da nossa reacção. Consequentemente, práticas laboratoriais específicas podem evitar a presença 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.

Esquema da placa HLA-B single Box 1.0



Identificação da placa HLA-B Box 1.0

Posição		HLA
1a	7a	B
1b	7b	B
1c	7c	B
1d	7d	B
1e	7e	B
1f	7f	B
1g	7g	B
1h	7h	B
2a	8a	B
2b	8b	B
2c	8c	B
2d	8d	B
2e	8e	B
2f	8f	B
2g	8g	B
2h	8h	B
3a	9a	B
3b	9b	B
3c	9c	B
3d	9d	B
3e	9e	B
3f	9f	B
3g	9g	B
3h	9h	B
4a	10a	B
4b	10b	B
4c	10c	B
4d	10d	B
4e	10e	B
4f	10f	B
4g	10g	B
4h	10h	B
5a	11a	B
5b	11b	B
5c	11c	B
5d	11d	B
5e	11e	B
5f	11f	B
5g	11g	B
5h	11h	B
6a	12a	B
6b	12b	B
6c	12c	Controlos
6d	12d	
6e	12e	
6f	12f	Vazios
6g	12g	
6h	12h	

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
Os controlos internos falharam em diversos poços	Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA	Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
		Repurifique a amostra de DNA
	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
Deteção de mais de dois alelos específicos	Amostra de DNA muito concentrada	Verifique a qualidade e concentração do DNA
		Dissolva o DNA em ddH_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
Esfregação 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 ddH_2O 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

Tabela de interpretação de resultados (2/2)

Nº do tubo	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4
Poço	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6
Banda específica	1	6	5	7	6	7	7	4	4	5	2	4	1	1	1
B*07	2	0	4	8	0	8	1	2	9	4	1	0	8	0	0
B*08	8	6	4	4	8	1	2	9	4	1	0	8	0	0	0
B*13															
B*14															
B*15	*												*		
B*18	+														
B*27															
B*35	+														
B*37		+													
B*38															
B*39															
B*40			+	*	*										
B*41						+									
B*42							+								
B*44		+													
B*45															
B*46								+							
B*47			+						+						
B*48					+										
B*49															
B*50															
B*51		+													
B*52															
B*53															
B*54									+						
B*55															
B*56															
B*57															
B*58															
B*59															
B*67															
B*73											+				
B*78	+											+			
B*81															

* Positivo para alguns subtipos

Folha de interpretação de resultados (1/2)

Poço		HLA	Alelo	Serotipo	ampl	contr*
1a	7a	B	B*5101-23 excepto *5115,*5201/03,*7801-04	B*51; 52; 78	504	256
1b	7b	B	B*5101-23 excepto *5110/131/15,*5201-03	B*51; 52	401	256
1c	7c	B	B*5101-23 excepto *5110/131/15,*7801/2,*1509	B*51; 78; 15	451	256
1d	7d	B	B*5201-03,*15012,*4026,*4028,*5107	B*52; 15; 40; 51	440	256
1e	7e	B	B*0702-24 excepto *0713/19/21,*4025,*8101,*3907,*4806,*6812	B*07; 40; 81; 39; 48; 68	619	256
1f	7f	B	B*0801-03/06-12,*3510	B*08; 35	606	256
1g	7g	B	B*4402-22 excepto *4406/06/15/16	B*44	537	256
1h	7h	B	B*4402-22 excepto 4406/16,*4501-03,*1514,*5002	B*44; 45; 15; 50	575	256
2a	8a	B	B*4501/03,*4901-03,*5001/02/04,*5402	B*45; 49; 50; 54	600	256
2b	8b	B	B*1301/02/06	B*13	471	256
2c	8c	B	B*1401-04	B*14	390	256
2d	8d	B	B*1501-07/12-15/19/20/24-28/31-36/38-40/43/46/49/50/53/54/55/57/60-62/64,*4003,*4802,*1304,*1801-12,*3520/28,*4003/20,*4417	B*15; 48; 13; 18; 35; 40; 44	422	256
2e	8e	B	B*1501/02/04-08/11-17/19-21/24-28/30/32-36/38/39/43/45/48/55-58/60/63,*4601/02,*5701-4,*1303/04,*4405/08	B*15; 46; 57; 13; 44	623	256
2f	8f	B	B*1509/10/18/21/23/27/51,*3526,*5122,*7803	B*15; 35; 51; 78	562	256
2g	8g	B	B*3801-06,*5119,*3920	B*38; 51; 39	500	256
2h	8h	B	B*1548,*3535,*39011-19/22-24,*6701	B*15; 35; 39; 67	507	256
3a	9a	B	B*67011/67012,*3910-17/20	B*67; 39	548	256
3b	9b	B	B*5701-07 excepto *5705	B*57	380	256
3c	9c	B	B*5801/04/05,*5705	B*58; 57	345	256
3d	9d	B	B*5801/04/05,*5104,*5301/02/04/06,*1513,*5705,*0712/14/18,*8301(*4406weak?)	B*58; 51; 53; 15; 57; 07; 83	319	256
3e	9e	B	B*1801-12	B*18	503	256
3f	9f	B	B*4901/03,*5901,*5115,*4418	B*49; 59; 51; 44	385	256
3g	9g	B	B*4901/02,*5001/02/04,*4005/15/16/23/26/28/32,*2704,*2706,*2710/15/18/20-22	B*49; 50; 40; 27	635	256
3h	9h	B	B*5401/02,*5501-03/05/07/09/10,*5601/02/04/07,*5901,*8201/02,*3917 Cw*15,	B*54; 55; 56; 59; 82; 39 Cw*15	490	256
4a	10a	B	B*5601-07,*8201/02,*8301,*0720/24	B*56; 82; 83; 07	551	256
4b	10b	B	B*2701-22 excepto *2712/16/18	B*27	150	256
4c	10c	B	B*3501-37 excepto *3512/20/22/26/28/31,*5301-06	B*35; 53	390	256
DNA1	DNA2					

Folha de interpretação de resultados (2/2)

Poço	HLA	Alelo	Serotipo	ampl	contr
4d	10d	B	B*3501-04/06-09/11/12/14/15/17-21/23-27/29/30/33-36,*5301-06,*1502/13/21/24,*5104,*4406/12,*0712/14/18,*8301	369	256
4e	10e	B	B*3501-37 excepto *3501/19/25-27,*18,*7801-04,*1522/59,*5305,*5606	128	256
4f	10f	B	B*3701,*4406,*5108	606	256
4g	10g	B	B*4001-34 excepto *4012/14/17/21/28,*4701-03	544	256
4h	10h	B	B*4001/07/14-16/22N/23/25/30-34,*27053,*3907	784	256
5a	11a	B	B*4001/10/12/14-16/21/22N/23/25/30-34,*4801/03/05/07,*0702/04-07/09-12/14/15/17/18/20/22-24,*8101	608	256
5b	11b	B	B*4101-05,*4202,*4405/18,*4501-03,*5002,*27053,*3907	781	256
5c	11c	B	B*4201/02,*0801-12,*3510,*3907	702	256
5d	11d	B	B*4601/02	459	256
5e	11e	B	B*4701-03,*2718,*3702	414	256
5f	11f	B	B*5401/02,	508	256
5g	11g	B	B*7301	289	256
5h	11h	B	B*7801-04, *1509/012,*4026/28,*5605/06	400	256
6a	12a	B	Bw4	180	256
6b	12b	B	Bw6 excepto B*5401	180	256
6c	12c	Controlo Positivo			256
6d	12d	Controlo Negativo			
6e	12e	Vazios			
6f	12f				
6g	12g				
6h	12h				
DNA1	DNA2				

****Os pares de primers controlo emparelham com sequências não polimórficas. Os primers de controlo positivo interno amplificam segmentos do gene HLA-DRB1 e PIC1. Originando fragmentos com 1600 + 796 pares de bases e 256 pares de bases, respectivamente.**

Na presença da banda específica a banda controlo pode ver diminuída a sua intensidade. A reacção de PCR só é válida 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.

Tabela de interpretação de resultados (1/2)

Nº do tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Poço	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g	1h	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h	3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g	3h	4a	4b	4c	4d
Banda esp	5a	4b	4c	4d	6e	6f	5g	5h	6i	4j	3k	4l	6m	5n	5o	5p	5q	3r	3s	3t	5u	3v	6w	4x	2y	1z	3aa	3ab
B*07						+																						
B*08							+																					
B*13										+																		
B*14											+																	
B*15			*					+			*	*	*						+									+
B*18																				+								
B*27																						+				+		
B*35																								+			*	*
B*37																												
B*38																+												
B*39																+												
B*40					+							+											+					
B*41																												
B*42																												
B*44								+	+						+													+
B*45									+																			
B*46															+													
B*47																												
B*48													+															
B*49									+													+	+					
B*50									+																			
B*51	+	+	+	+																+								+
B*52	+	+		+																+								
B*53																											+	+
B*54																								+				
B*55																								+				
B*56																								+	+			
B*57													+					+										
B*58																		+	+									
B*59																					+			+				
B*67															+	+												
B*73																												
B*78	+		+																									
B*81					+																							

* Positivo para alguns subtipos