



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2021 - Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein

Disposición

Número:

Referencia: 1-47-3110-6607/18-2

VISTO el expediente N° 1-47-3110-6607/18-2 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma FELSAN S.R.L solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos de los Productos para diagnóstico uso In Vitro denominados **1) BAGene Rare – TYPE (ref. 6653); 2) BAGene HNA – TYPE (ref. 66701); 3) Happy Taq (ref. 70976).**

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decretos N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de los productos médicos para diagnóstico de uso In Vitro denominados **1) BAGene Rare – TYPE (ref. 6653); 2) BAGene HNA – TYPE (ref. 66701); 3) Happy Taq (ref. 70976)**, de acuerdo a lo solicitado por la firma FELSAN S.R.L con los datos característicos que figuran al pie de la presente.

ARTICULO 2º.- Autorícense los textos de los proyectos de rótulos y Manual de

Instrucciones que obran en el documento N° IF-2021-38992918-APN-INPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM 1544-7”, con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTÍCULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta Disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizado y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERISTICOS

Nombre comercial: **1) BAGene Rare – TYPE (ref. 6653); 2) BAGene HNA – TYPE (ref. 66701); 3) Happy Taq (ref. 70976)**.

Indicación de uso: **1) KITS DE PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS RAROS, EL KIT DETERMINA LOS SIGUIENTES ALELOS: KEL *02.03, KEL *02.04, KEL *02.06, KEL *02.07, DI*01, DI*02, LU*01, LU*02, DO*01, DO*02, CO*01.01, CO*02, YT*01, YT*02, Vel- y Vel+; 2) KITS DE PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS SIGUIENTES ALELOS: HNA 1a/b/c, 3a/b, 4a/bw, 5a/bw; 3) ENZIMA RECOMBINANTE TERMOESTABLE.**

Forma de presentación: 1) y 2) Envases por 10 (diez) determinaciones, conteniendo: PCR PLATE (10 unidades), PCR Buffer 10x (1 vial x 1,1 ml), PCR CAP (2 x 12 unidades); 3) 1 vial x 50 µ

Período de vida útil y condición de conservación: 1) y 2) 24 (VEINTICUATRO) meses, desde la fecha de elaboración conservado a $\leq -20^{\circ}\text{C}$; 3) 18 (DIECIOCHO) meses, desde la fecha de elaboración conservado a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

Condición de venta: venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Nombre y dirección del fabricante: BAG Health Care GmbH. Amtsgerichtsstrasse 1-5. 35423 Lich.
(ALEMANIA).

Expediente N° 1-47-3110-6607/18-2

AM

Digitally signed by GARAY Valeria Teresa
Date: 2021.05.14 09:17:55 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2021.05.14 09:18:08 -03:00





PROYECTO DE ROTULOS

1) BAGene SSP Kits: Rare-TYPE (REF 6653)

Rotulo de envase secundario

Labels: BAGene Rare-TYPE **REF 6653**

Label: Outer box


Rare-TYPE  


REF 6653


BLOOD TYPING KEL*3, KEL*4, KEL*6, KEL*7, DI*1, DI*2, LU*1, LU*2, DO*1, DO*2, CO*1, CO*2, YT*1, YT*2, Vel-, Vel+

CONT

10 x	PCRPLATE	LOT	605RA2
1,1ml	PCRBUF 10x	LOT	P020218
2 x 12	PCRCAP		
1	BAGene INFORMATION CD	LOT	605RA2
	eIFU V13/2018		

IVD  $\leq -20^{\circ}\text{C}$

LOT 605RA2  **2020-02**

 **BAG HEALTHCARE** Amtsgerichtsstraße 1-5 35423 Lich / Germany

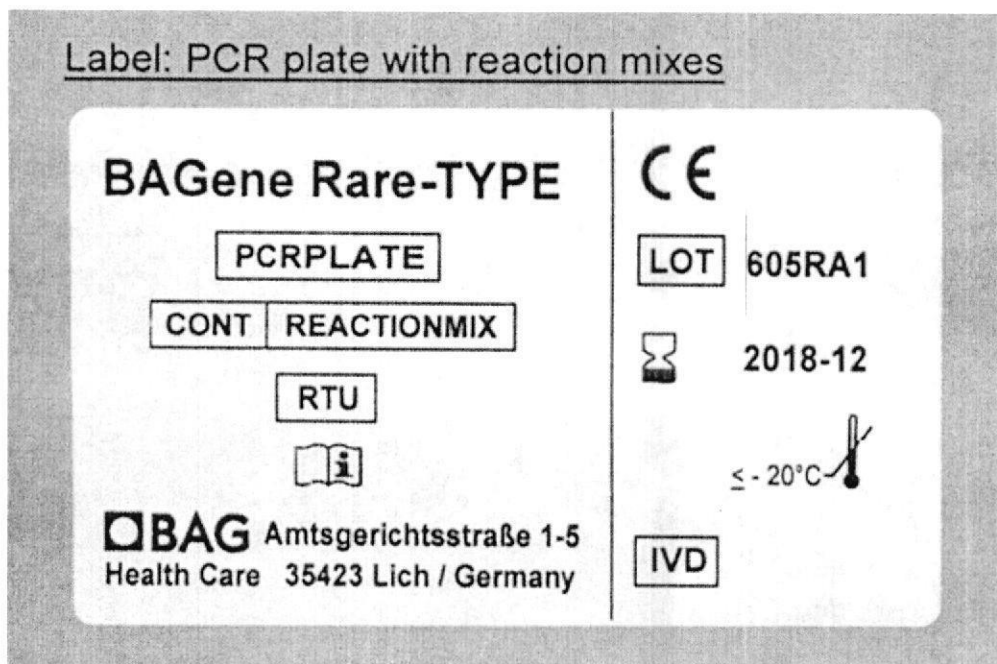
Roque Mesrinosa
ROQUE MESRINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

Andrés Santín
EELSAN S.R.L.
LIC. ANDRÉS SANTÍN
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE

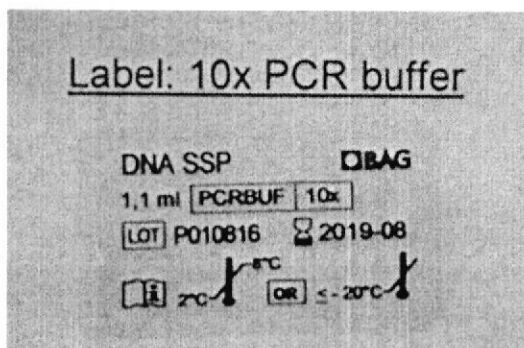
H



Rotulo de envase primario: Placas/tiras de PCR/Mezclas de reacción



Rotulo de envase primario: Buffer PCR



Sobre rotulo- Envase secundario

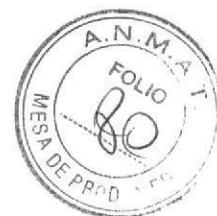
Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 - C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Bioq. Luis Espinosa MN 9315
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro N° PM-1544-7

ROQUE ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTÍN
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE




BAGene SSP Kits: HNA-TYPE (REF 66701)

Rotulo de envase secundario

Labels: BAGene HNA-TYPE **REF 66701**

Label: Outer box

HNA-TYPE  **CE**

REF 66701

HNA TYPING HNA 1a/b/c, 3a/b, 4a/bw, 5a/bw

CONT


10 x **PCRPLATE** **LOT 808HN2**


1,1ml **PCRBUF 10x** **LOT P020218**


2 x 12 **PCRCAP**

1 **BAGene INFORMATION CD** **LOT 808HN2**

eIFU V13/2018

IVD  $\leq -20^{\circ}\text{C}$

LOT 808HN2  **2020-05**


 **BAG HEALTHCARE** Amtsgerichtsstraße 1-5 35423 Lich / Germany

Rotulo de envase primario: Placas/tiras de PCR/Mezclas de reacción


Label: PCR plates with reaction mixes


BAGene HNA-TYPE **CE**

PCRPLATE **LOT 707HN1**

CONT REACTIONMIX  **2019-02**

RTU $\leq -20^{\circ}\text{C}$



 **BAG Health Care** Amtsgerichtsstraße 1-5 35423 Lich / Germany

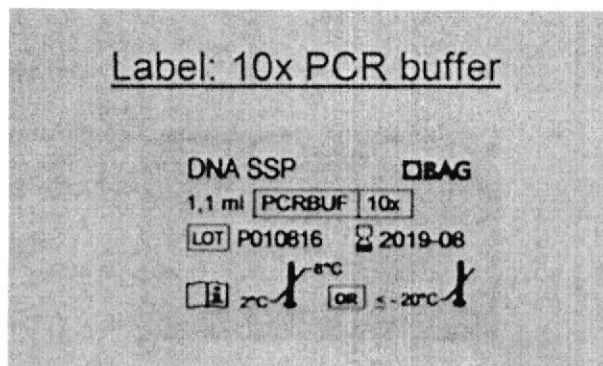
IVD

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9815

DEL SAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTINI
C.NI 26.644.967
SOCIO GERENTE



Rotulo de envase primario: Buffer PCR




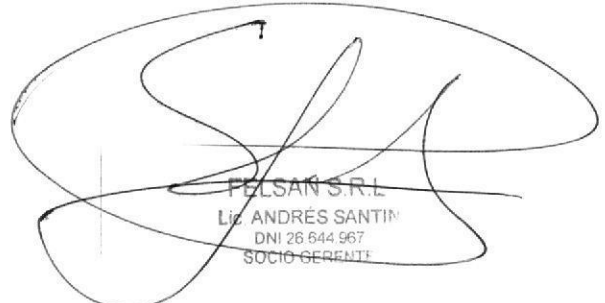
Sobre rotulo- Envase secundario

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 - C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Bioq. Luis Espinosa MN 9315
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro N°: PM-1544-7


ROQUEL ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315


FELSAN S.R.L.
LIC. ANDRÉS SANTIN
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE

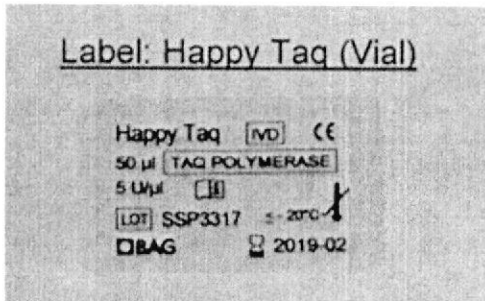


2) Happy Taq (REF 70976)

Rotulo de envase secundario



Rotulo de envase primario



Sobre rotulo- Envase secundario

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 - C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Director Técnico: Bioq. Luis Espinosa MN 9315
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro N°: PM-1544-7

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
LIC. ANDRÉS SANTIN
DNI-26.644.967
SOCIO GERENTE



PROYECTO DE ROTULOS

1) BAGene SSP Kits: Rare-TYPE (REF 6653)

Rotulo de envase secundario

Labels: BAGene Rare-TYPE **REF 6653**

Label: Outer box

Rare-TYPE ▽₁₀ CE

REF 6653

BLOOD TYPING KEL*3, KEL*4, KEL*6, KEL*7, DI*1, DI*2, LU*1, LU*2, DO*1, DO*2, CO*1, CO*2, YT*1, YT*2, Vel-, Vel+

CONT

10 x	PCRPLATE	LOT	605RA2
1,1ml	PCRBUF 10x	LOT	P020218
2 x 12	PCRCAP		
1	BAGene INFORMATION CD	LOT	605RA2
	eIFU V13/2018		

IVD ≤ -20°C

LOT 605RA2 ⌚ **2020-02**

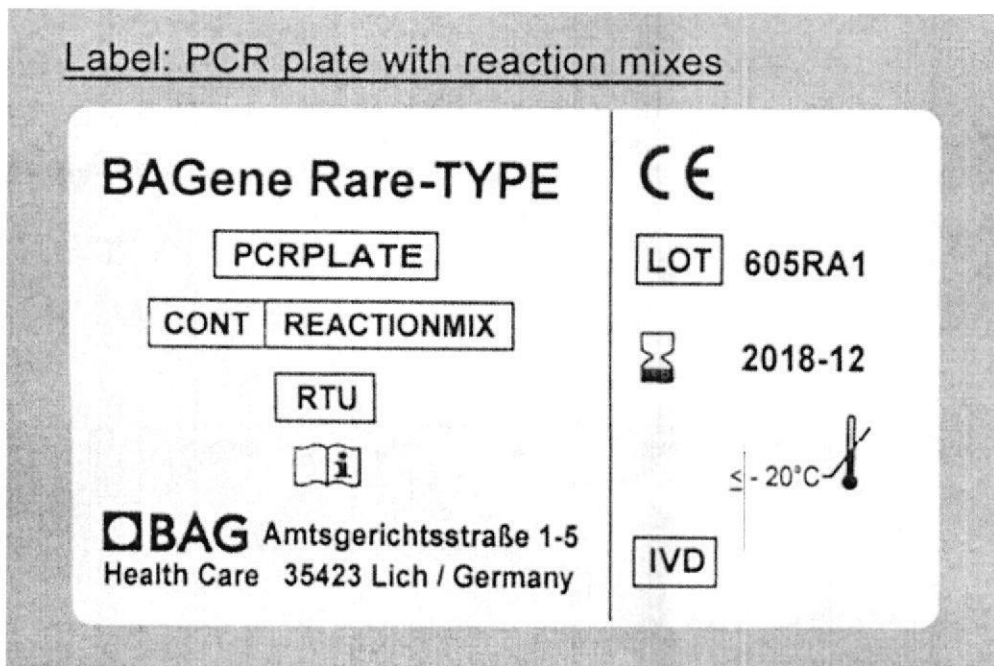
BAG HEALTHCARE Amtsgerichtsstraße 1-5 35423 Lich / Germany

ROQUE A. ESPINOSA
 Bioclinico
 M.N. 9315

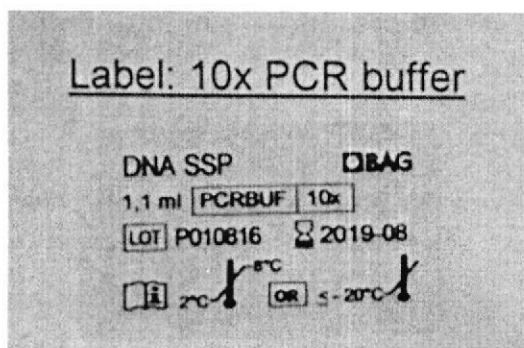
FELSAN S.R.L.
 Lic. ANDRES SA...
 DNI 26.644.967
 SOCIO GERENTE



Rotulo de envase primario: Placas/tiras de PCR/Mezclas de reacción



Rotulo de envase primario: Buffer PCR



Sobre rotulo- Envase secundario

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba Nº 288 - C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Bioq. Luis Espinosa MN 9315
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro Nº: PM-1544-7

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
MN 9315

FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTIF
CNI 26.644.967
SOCIO GERENTE




BAGene SSP Kits: HNA-TYPE (REF 66701)

Rotulo de envase secundario

Labels: BAGene HNA-TYPE **REF 66701**

Label: Outer box



HNA-TYPE  **CE**

REF 66701

HNA TYPING HNA 1a/b/c, 3a/b, 4a/bw, 5a/bw

CONT

10 x	PCRPLATE	LOT	808HN2
1,1ml	PCRBUF 10x	LOT	P020218
2 x 12	PCRCAP		
1	BAGene INFORMATION CD	LOT	808HN2
	eIFU V13/2018		

IVD  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  **2020-05**


BAG HEALTH CARE Amtsgerichtsstraße 1-5 35423 Lich / Germany


Rotulo de envase primario: Placas/tiras de PCR/Mezclas de reacción

Label: PCR plates with reaction mixes

BAGene HNA-TYPE **CE**

PCRPLATE **LOT 707HN1**

CONT REACTIONMIX  **2019-02**

RTU $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 

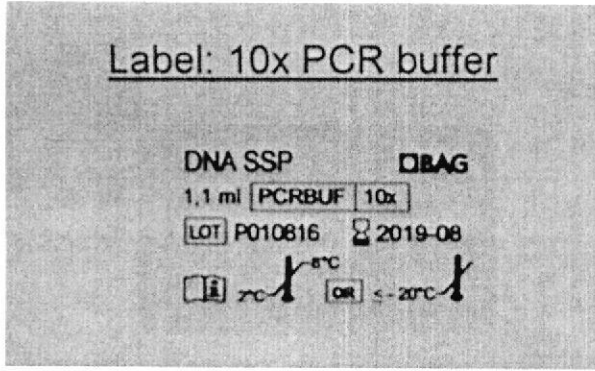
BAG Health Care Amtsgerichtsstraße 1-5 35423 Lich / Germany **IVD**

ROQUEL ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTINI
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



Rotulo de envase primario: Buffer PCR



Sobre rotulo- Envase secundario

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba Nº 288 - C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Bioq. Luis Espinosa MN 9315
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro Nº: PM-1544-7

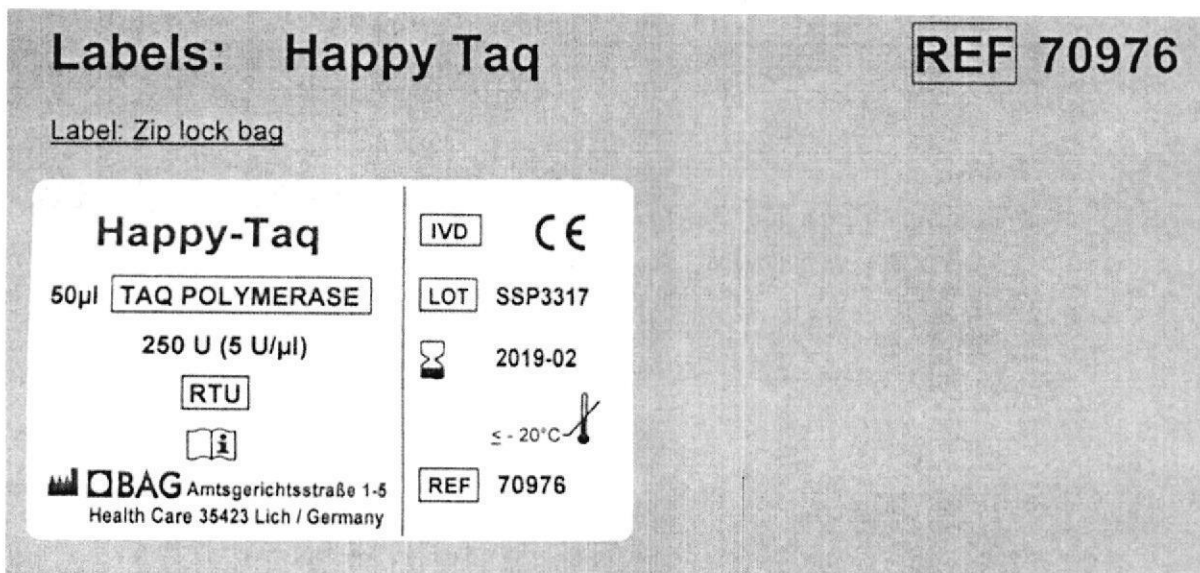

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315


FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTÍN
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE

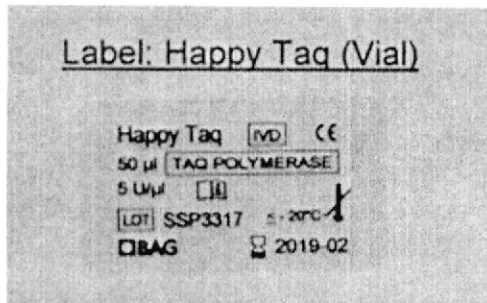


2) Happy Taq (REF 70976)

Rotulo de envase secundario



Rotulo de envase primario



Sobre rotulo- Envase secundario

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 - C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Director Técnico: Bioq. Luis Espinosa MN 9315
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro N°: PM-1544-7

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTILLANA
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE





PROYECTO DE ROTULOS

1) BAGene SSP Kits: Rare-TYPE (REF 6653)

Rotulo de envase secundario

Labels: BAGene Rare-TYPE **REF 6653**

Label: Outer box



Rare-TYPE  

REF 6653


BLOOD TYPING KEL*3, KEL*4, KEL*6, KEL*7, DI*1, DI*2, LU*1, LU*2, DO*1, DO*2, CO*1, CO*2, YT*1, YT*2, Vel-, Vel+

CONT

10 x	PCRPLATE	LOT	605RA2
1,1ml	PCRBUF 10x	LOT	P020218
2 x 12	PCRCAP		
1	BAGene INFORMATION CD	LOT	605RA2
	eIFU V13/2018		

IVD  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  **2020-02**

LOT 605RA2

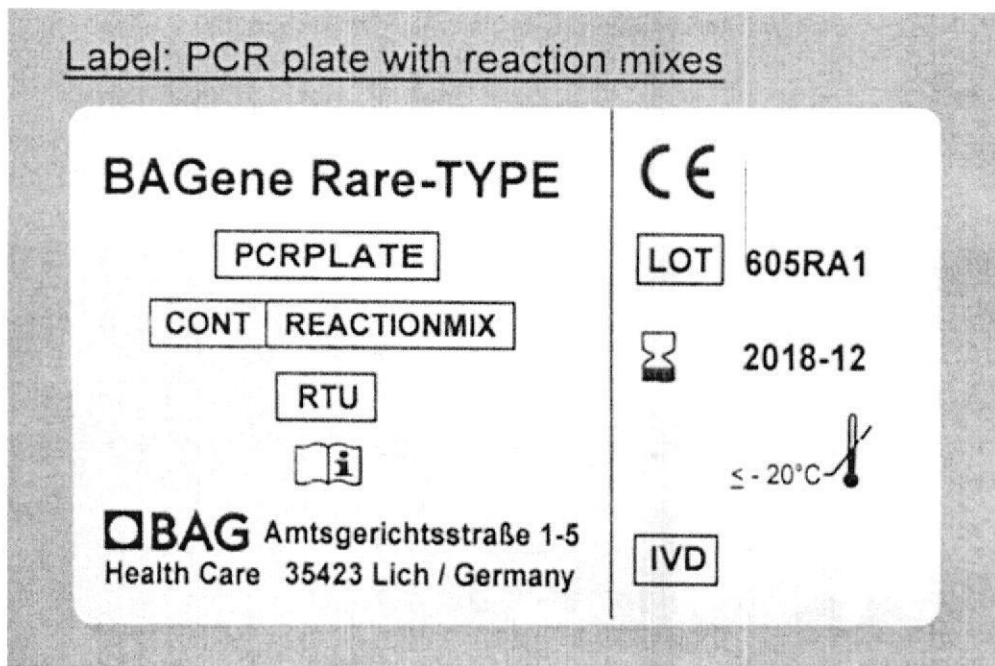
 **BAG** HEALTHCARE Amtsgerichtsstraße 1-5 35423 Lich / Germany


ROQUEL ESPINOSA
Bióquímico
M.N. 9315

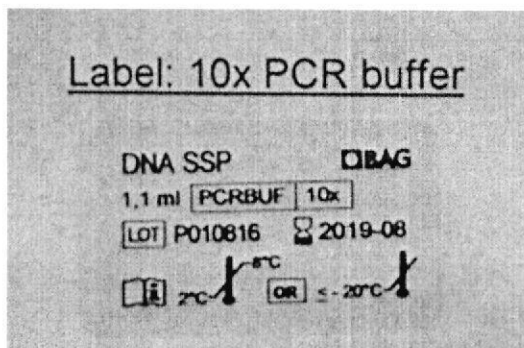

FELSAN S.R.L.
LIC. ANDRÉS SANTIN
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



Rotulo de envase primario: Placas/tiras de PCR/Mezclas de reacción



Rotulo de envase primario: Buffer PCR



Sobre rotulo- Envase secundario

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 - C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Bioq. Luis Espinosa MN 9315
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro N° PM-1544-7

ROQUE L. ESPINOSA
Biotecnólogo
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTI
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



BAGene SSP Kits: HNA-TYPE (REF 66701)

Rotulo de envase secundario

Labels: BAGene HNA-TYPE **REF 66701**

Label: Outer box

HNA-TYPE Σ 10 CE

REF 66701

HNA TYPING HNA 1a/b/c, 3a/b, 4a/bw, 5a/bw

CONT

10 x	PCRPLATE	LOT 808HN2
1,1ml	PCRBUF 10x	LOT P020218
2 x 12	PCRCAP	
1	BAGene INFORMATION CD	LOT 808HN2
	eIFU V13/2018	

IVD ≤ -20°C

LOT 808HN2 **2020-05**

BAG HEALTH CARE Amtsgerichtsstraße 1-5 35423 Lich / Germany

Rotulo de envase primario: Placas/tiras de PCR/Mezclas de reacción

Label: PCR plates with reaction mixes

BAGene HNA-TYPE CE

PCRPLATE

CONT REACTIONMIX

RTU

BAG Health Care Amtsgerichtsstraße 1-5 35423 Lich / Germany

LOT 707HN1

2019-02

≤ -20°C

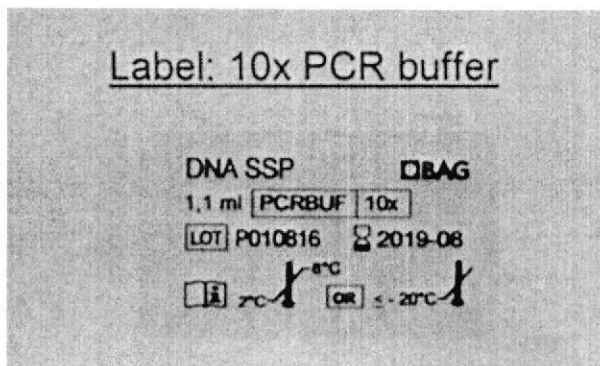
IVD

ROQUE L. ESPINOSA
 Biotecnólogo
 M.N. 9315

[Signature]
FELSAN S.R.
 Lic. ANDRÉS SANTILLANA
 DNI 26.644.967
 SOCIO GERENTE



Rotulo de envase primario: Buffer PCR



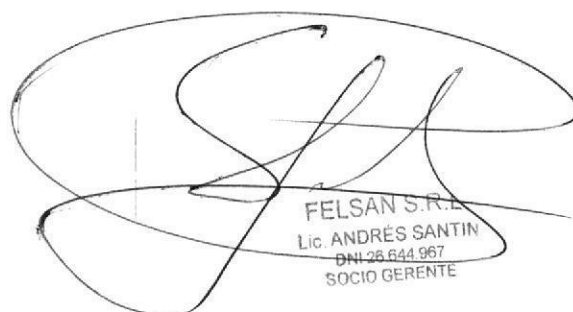
Sobre rotulo- Envase secundario

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 - C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Bioq. Luis Espinosa MN 9315
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro N°: PM-1544-7

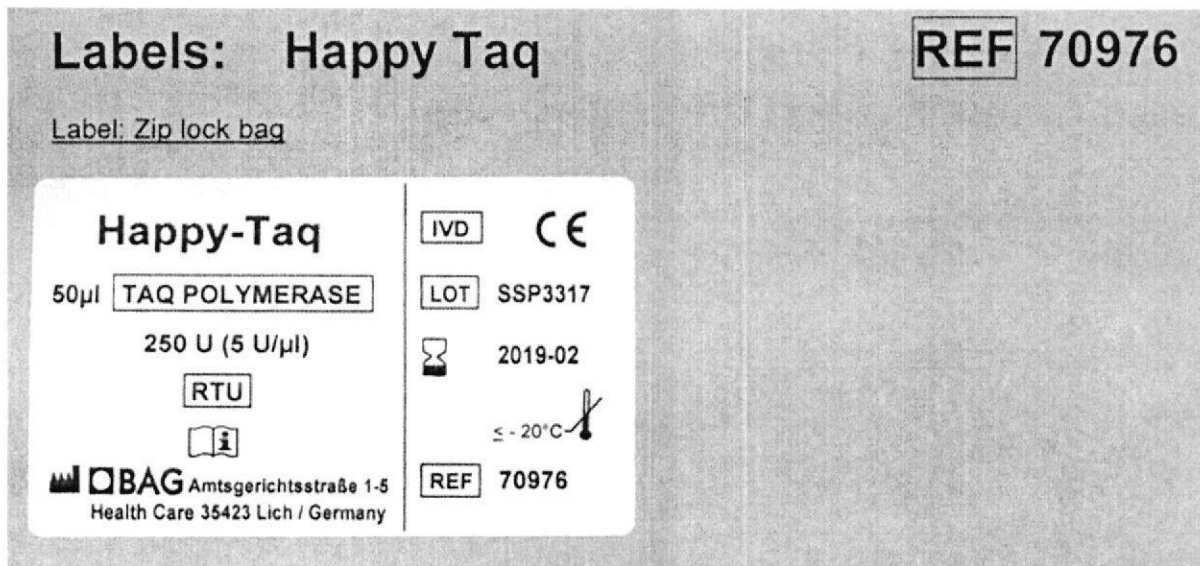

ROQUET L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315


FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTÍN
DNI-28.644.967
SOCIO GERENTE

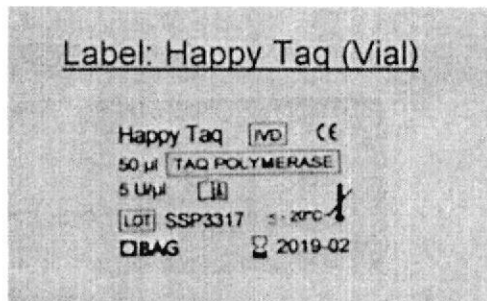


2) Happy Taq (REF 70976)

Rotulo de envase secundario



Rotulo de envase primario



Sobre rotulo- Envase secundario

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 - C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Director Técnico: Bioq. Luis Espinosa MN 9315
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro N°: PM-1544-7

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SA...
DNI 26 644.96
SOCIO GERENTE



Proyecto de Manual de Instrucciones



EN

Instrucciones de uso

BAGene SSP Kits

Ver manual de instrucciones en formato digital: www.bag-healthcare.com

X IVD

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

Listo para usar pre-alicuotadas

REF 6640	ABO-TYPE
REF 6641	ABO-TYPE variant
REF 6645	RH-TYPE
REF 6646	Partial D-TYPE
REF 6647	Weak D-TYPE
REF 6648	D Zygotity-TYPE
REF 6650	KKD-TYPE
REF 6652	MNS-TYPE
REF 6653	Rare-TYPE
REF 6660	HPA-TYPE
REF 66701	HNA-TYPE

Contents

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

ROQUE L. ESPINOSA
 Bioquímico
 M.N. 9315

FELSAN S.p.A.
 Lic. ANDRÉS SANTI
 DNI 26.644.967
 SOCIO GERENTE

I

1. Descripción del producto

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

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

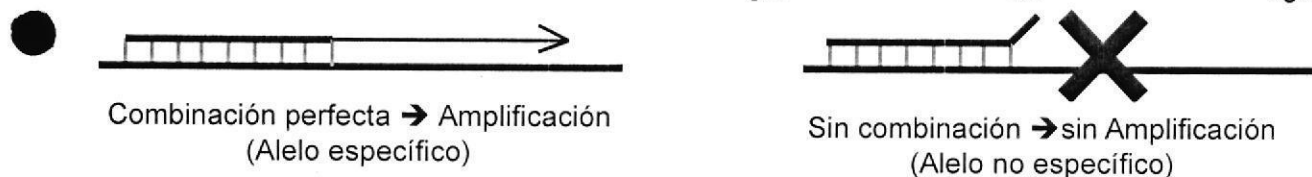


Fig. 1 Principios SSP-PCR

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

2. Materiales

2.1. Contenido de BAGene kits

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

2.2. Material requerido pero no incluido.

- ◆ Happy Taq (REF 70976) (u otra Taq Polimerasa, validada con el BAGene kits por el usuario). El Happy Taq se suministra sin cargo con la compra del BAGene Kit.
No usar una Hot-start Taq Polimerasa (ej. Ampli Taq Gold)!
- ◆ EXTRA GENE I kit (REF 7059) (opcional) para extracción de AND a partir de sangre/linfocitos/ leucocitos o material para otros métodos de extracción de AND
- ◆ Pipetas piston (0.5 - 250 µl)
- ◆ Tips estériles con filtro integrado
- ◆ Termociclador (Ver pág. 6 lista de termocicladores validados)
- ◆ AND agarosa
- ◆ 0.5x TBE buffer (45 mM de Tris, 45 mM ácido bórico, 0.5 mM de EDTA)
- ◆ Bromuro de Etidio (BrEt)
- ◆ Unidad submarina de electroforesis

ROQUE L. ESPINOSA
Biotecnológico
M.N. 9315

EEL SAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTOS
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



- ◆ Fuente de energía (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ DNA-length standard (REF 7097)
- ◆ Fuente de UV (Transiluminador, 220-310 nm)
- ◆ Sistema de documentación de Gel.

2.3. Almacenamiento y Estabilidad

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

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

3. Datos de desempeño

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

La precisión y reproducibilidad de cada mezcla de primers específica fueron verificadas para cada lote con muestras de AND control con especificidades conocidas.

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

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

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

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

Se garantiza una tipificación confiable utilizando de 50 - 100 ng de ADN per reaction mix.

D Zygosity-TYPE representa una excepción a esto debido a un programa más largo de PCR, por lo que para este producto se debe utilizar una concentración menor de ADN de 30 - 50 ng por mezcla de reacción

4. Procedimiento de prueba

4.1. Condiciones de seguridad y observaciones especiales

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

ROQUE ESPINOSA
Bióquimico
M.N. 9315

PELSAN S.R.L.
LIC. ANDRÉS SANTI
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



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

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

4.2. Extracción de ADN

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

Métodos validados para la extracción de ADN:

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

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

El ADN debería tener los siguientes índices de pureza:

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

4.3. Amplificación

Todas las mezclas de reacción prealiquotadas ya contienen "primers" específicos de alelos y controles y nucleótidos. Estos se suministran secos en el fondo del tubo de reacción. Los parámetros de amplificación están optimizados para un volumen final de 10 μ l.

1. Tomar de los "kits" el número de placas/tiras de $\leq -20^{\circ}\text{C}$ y descongelar el tampón de PCR 10x.
2. Pipetear la Master-Mix formada por tampón de PCR 10x, solución de ADN, Taq-Polimerasa y H₂O destilada y mezclar bien. Los diferentes "kits" BAGene funcionan con la misma Master-Mix y por lo tanto se pueden combinar, excepto el "kit" D Zygotity-TYPE para el que se recomienda otra concentración de ADN. La composición de la Master-Mix se muestra en la Tabla 1.

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.P. 9315

FELSAN S.A.
Lic. ANDRÉS SANTÍN
DNI 26 644 967
SOCIO GERENTE



Tabla 1: Composición de la Master-Mix dependiendo del No de mezclas de reacción:

No. de mezclas	Agua Dest.	10x PCR buffer	Solución ADN (50-100 ng/μl) ♣	Happy Taq (5 U/μl)	Volumen total
1	8	1	1	0,08	10 μl
2	16	2	2	0,2	20 μl
6☆	50	7	7	0,5	65 μl
7	70	9	9	0,7	90 μl
8	80	10	10	0,8	100 μl
9	88	11	11	0,9	110 μl
10	96	12	12	1,0	120 μl
11	104	13	13	1,0	130 μl
12	112	14	14	1,1	140 μl
13	128	16	16	1,3	160 μl
14	136	17	17	1,4	170 μl
15	144	18	18	1,4	180 μl
16	152	19	19	1,5	190 μl
18	166	21	21	1,7	210 μl

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

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

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

♣ Para el "kit" D Zygosity-TYPE se recomienda una concentración de ADN de 30 – 50 ng/μl.

3. Tras agitar en el vortex, añadir 10 μl de esta mezcla inmediatamente a las mezclas precargadas y secas. Cambiar de punta tras cada paso de pipeteo. Cerrar los tubos fuerte con sus respectivos tapones o con una lámina adhesiva. Asegurarse de no tocar con los dedos la parte interior de los tapones o los bordes superiores de los tubos para evitar contaminaciones. Si se usan termocicladores con tapa de ajuste fuerte, también es posible usar alfombrillas de PCR reutilizables. Agitar ligeramente la placa para disolver el pellet del fondo del tubo. Toda la solución de PCR debe quedarse en el fondo. Si fuera necesario la placa debería ser centrifugada un instante.

4. Colocar los tubos de reacción con firmeza en el termociclador y apretar bien la tapa para que los tubos no se deformen con el calor. Iniciar el programa de PCR. ¡¡No es necesario recubrir las mezclas de reacción con aceite mineral si se usa una tapa caliente y ajustada!!

Marcando →	Nro lote.	
Mezcla de reacción →	①	⑨
	②	⑩
	③	.
	④	.
	⑤	.
	⑥	.
	⑦	.
	⑧	.

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

DILSAN S.R.L.
L.C. ANDRÉS SANTINI
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



Parámetros de Amplificación para todos los kits BAGene excepto D Zygosity-TYPE

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

Validated Thermal Cyclers

PTC 200 / C1000

(MJ Research/ BioRad),
GeneAmp PCR-System
9700 (usar tasa de
calentamiento del 9600)
(ABI),

Mastercycler epGradient
S (usar la función
"simular gradiente de
Mastercycler")
(Eppendorf)

Tprofessional (Biometra)

**!!! ATENCIÓN: Programa de PCR diferente !!!
Parámetros de Amplificación para D Zygosity-TYPE**

Programa-Paso	Tiempo	Temp.	No. De Ciclos
Desnat. Inicial	10 Min	95°C	1 Ciclo
Desnaturalización	20 Sec	92°C	35 Ciclos
Anilamiento	30 Sec	64°C	
Extension	5 Min	68°C	
Extension Final	5 Min	72°C	1 Ciclo

**Termocicladores
Validados**

Ver parámetros de
amplificación para otros
BAGene kits

**!! No usar bloques térmicos de aluminio (p.ej.: GeneAmp PCR-System 9700) !!
Cuando se usen termocicladores con tasas muy rápidas de calentamiento y enfriamiento, se
recomienda usar una rampa térmica reducida (~ 2.5°C/seg).
Dado que los termocicladores de diferentes fabricantes rinden de manera distinta e incluso
máquinas individuales de un tipo pueden estar calibradas diferentemente, puede ser
necesario optimizar los parámetros de amplificación.**

Para optimizar un termociclador usar la siguiente guía:

Si hay **reacciones falsas positivas** (bandas inespecíficas, tipos adicionales), aumentar la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C.

Si hay **reacciones falsas negativas** (bandas y/o controles de amplificación desaparecidos), disminuir la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C y/o aumentar los tiempos de anillamiento en pasos de 5 segundos y/o aumentar los tiempos de desnaturalización en pasos de 5 segundos

Se recomienda usar exclusivamente termocicladores calibrados con regularidad. El "kit" CYCLER CHECK (REF 7104) es muy adecuado para este fin.

ROQUE L. ESPINOSA
Biotecnológico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
LIC. ANDRÉS SANTIN
DNI 26 644 967
SOCIO GERENTE

4.4. Electroforesis en GEL

La separación de los productos de amplificación se realiza usando un gel (horizontal) de agarosa. Como tampón para la electroforesis, se recomienda TBE 0,5x (45 mM de tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA). La concentración del gel debe ser del 2,0 – 2,5% de agarosa. Dejar polimerizar el gel al menos 30 minutos antes de cargar las muestras.

Al terminar la amplificación, sacar las muestras del termociclador y cargar cuidadosamente todas las muestras de reacción completas en cada pocillo del gel. Además, aplicar 10µl de un estándar de longitud de ADN para comparar los tamaños. La separación electroforética se hace a 10 - 12 V/cm (con una distancia de unos 20 cm entre los electrodos, aprox. 200 - 240V), durante 20 - 40 minutos. Se recomiendan 40 minutos para mejorar la separación de las bandas al usar D Zygoty-TYPE. Tras finalizar, se tiñe el gel completo en una solución de Bromuro de Etidio (EtBr) (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr en H₂O o tampón TBE) durante 30 - 40 minutos. Como alternativa, el EtBr (0,5 µg/ml) se puede añadir al tampón de electroforesis o al gel de agarosa. Si fuese necesario, se puede eliminar el exceso de EtBr empapando el gel en H₂O o en tampón TBE 0,5x durante 20 - 30 minutos.

4.5. Documentación

Para la documentación, visualizar el amplificado de la PCR usando un transiluminador UV (220 - 310nm) y un sistema adecuado de documentación de geles. Elegir el tiempo de exposición y la apertura de tal manera que las bandas se vean nítidas y destaquen frente al fondo oscuro (apertura aproximada 11, tiempo de exposición 1 segundo). Los resultados se documentan en la hoja de tareas suministrada (ver punto 4.6)

4.6. Interpretación de resultados y limitaciones del método

4.6.1. General

Los resultados obtenidos con los "kits" BAGene son documentados en las hojas de tareas suministradas. En las hojas de tareas están listadas en una tabla todas las características, especificidades, fenotipos y genotipos, y un ejemplo de patrón de reacción sirve como apoyo a la interpretación. Las preparaciones de PCR tiene números de reacción (p.ej.: ABO-TYPE reacción no 1 - 8). La longitud del fragmento de ADN se indica en bp bajo los números de reacción en la hoja de tareas. Se muestran posibles patrones de bandas del gel en las líneas de abajo. Los productos específicos de PCR (reacciones positivas) se designan como "+" y los cuadros correspondientes del diagrama tienen un fondo coloreado. Los "kits" ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygoty-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, HPA-TYPE y HNA-TYPE están resaltados en **gris**, RH-TYPE additional en **rojo, verde y azul**. La evaluación de los patrones de reacción se lleva a cabo en las líneas de izquierda a derecha.

Sólo se deben considerar positivas las bandas que tengan el tamaño correcto en comparación con el estándar de longitud de ADN. Los tamaños correctos vienen en las hojas de trabajo. En todas las calles sin amplificación específica de alelo, se debe ver claramente una banda de **434bp** del control interno. Son excepciones **D Zygoty-TYPE** y la reacción de PCR con no2 de mezcla de **RH-TYPE** que muestra un control interno de **659bp**. ¡En la mayoría de los casos con una amplificación específica de alelo la banda del control interno es más débil o incluso desaparece completamente!. Si no hay una banda específica y no aparece la banda de control interno, el resultado con la mezcla relevante no puede ser usado para la evaluación.

Para resultados inapropiados ver resolución de problemas (punto 6).

Si no se pudiera obtener un resultado claro con los "kits" BAGene (p.ej.: debido a alelos desconocidos que no se pueden detectar con los "primers" existentes), se deben seguir las normas nacionales de transfusión en concordancia con los tipajes serológicos. Se recomienda el análisis de esas muestras por secuenciación. Los resultados de tipaje se deben interpretar

teniendo en cuenta la varianza genética de los diferentes grupos étnicos. En caso de duda, el fenotipo es válido.

4.6.2. Kits ABO-TYPE y ABO-TYPE variant

La expresión homocigota de los alelos ABO*O01, ABO*O03, ABO*B101, ABO*A201 se indica por medio de las bandas en la correspondiente reacción de PCR (1, 3, 5, ó 7). En heterocigosis todas las cuatro "no-reacciones" tienen que tener una banda en el gel (2, 4, 6, y 8) además de dos preparaciones específicas de PCR (1, 3, 5, 7). La homocigosis del alelo ABO*A101 se indica sólo por bandas en todas las cuatro "no-reacciones" (2, 4, 6, 8), dado que no hay ninguna preparación específica para ABO*A101. La constelación de heterocigosis de ABO*A101 se puede reconocer por una banda adicional de las reacciones específicas de alelo (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16).

Dado que sólo una selección de alelos de la *variante A* pueden ser detectados por el "kit" ABO-TYPE variant, otros alelos de la *variante A* pueden estar ocultos por el resultado de PCR **ABO*A101**. Dado que sólo una selección de alelos de la *variante B* y ningún alelo de la *variante A*² pueden ser detectados por el "kit" ABO-TYPE variant, otros alelos de las *variantes B* o *A*² pueden estar ocultos por los resultados de PCR **ABO*B101** y **ABO*A201** respectivamente. La mayoría de los alelos *B*^(A) y *cis AB* también muestran un resultado positivo en la reacción ABO*B101.

Aparece una banda específica para la HGH con una longitud de 434 bp como control interno..

Consultar también las observaciones especiales en las hojas de tareas de los "kits" ABO-TYPE y ABO-TYPE variant.



4.6.3. Kit RH-TYPE

La determinación molecular de RHD estándar así como de algunas variantes RHD (haplotipos RHD positivos en especímenes negativos para D serológicamente, D parcial) son realizados en reacciones designadas de PCR.


Las preparaciones 1 y 2 son raciones de PCR Múltiple para examinar 5 polimorfismos de *RHD* (intrón 4 y 7 de *RHD*, exón 7, así como la detección específica de *RHD* (W16X) y *RHD*Ψ). Esto significa que, en contraste con todos los otros "kits" BAGene (excepto para la banda del control interno) no sólo uno, sino también pueden aparecer dos amplicones en una reacción de PCR. Para facilitar la evaluación, los cuadros respectivos están divididos cuando pueden aparecer dos bandas posibles y tienen un fondo bicolor. Las longitudes de los fragmentos de los productos de PCR y los polimorfismos están identificados también con un color específico según los cuadros del patrón de reacción.

Ejemplo *RHD*Ψ:

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

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


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

- Producto de PCR: 154 bp – identificación roja, patrón de reacción en cuadro fondo rojo 

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
LIC. ANDRÉS SANTIN
CIN 26.644.967
SOCIO GERENTE



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

Las reacciones de PCR designadas se usan para la determinación genética molecular de las características del locus del gen RHCE. Aparece una banda con una longitud de 434bp, específica para la HGH como control interno. Excepción: la reacción de PCR no 2 donde aparece una banda control de 659bp (secuencia genómica del cromosoma I, 90 kbp 5' de la Caja Rhesus). Si el patrón de reacción indica una categoría D, se puede realizar un examen posterior usando el "kit" Partial D-TYPE para excluir mutaciones puntuales como una causa de estos resultados.

4.6.4. Kit Partial D-TYPE

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

Actualmente no es posible la diferenciación genética molecular del *RHD* estándar de las variantes de D: *DCS*, *DFW*, *DIM*, *DNU*. La consideración de los haplotipos es útil.

4.6.5. D Zygotity-TYPE

Para alelos *RHD*, que no pueden ser determinados serológicamente (RhD neg.), puede suceder una discrepancia entre los resultados de la prueba serológica y el genotipado. La detección positiva de la *Caja Rhesus* "Downstream" muestra la presencia de un alelo *RHD* (*RHD* pos.), excepto *RHD Ψ* homocigotos y hemizigotos respectivamente. La reacción aquí resultante es negativa aunque un alelo *RHD* esté presente.

Además, el resultado con una *Caja Rhesus* "Downstream" genéticamente modificada puede ser también falsa negativa, aunque el espécimen sea serológicamente D-positivo. Por tanto, con un resultado positivo para D serológicamente y PCR positiva para la *Caja Rhesus* Híbrida, el resultado es "Dd." Es "DD" cuando es un resultado negativo de PCR para la *Caja Rhesus* Híbrida. Debido al polimorfismo característico de la *Caja Rhesus* Híbrida de los africanos, puede aparecer un resultado falso positivo en presencia de *RHD Ψ* y otro alelo *RHD*.

En el caso de una *Caja Rhesus* Híbrida perdida en la población negra, los resultados para los alelos *RHD Ψ* y *Cde^S* obtenidos usando **RH-TYPE** tiene que ser considerados. Otros alelos *RHD* con antígeno D negativo no se pueden excluir con los "kits" de pruebas disponibles actualmente. Esto debe ser considerado en la interpretación de los resultados. Sin embargo la incidencia de estos alelos en la población blanca es bastante baja.

El ADN degradado puede producir resultados falsos negativos. Esto se puede observar por la presencia única de las bandas del control interno o por la ausencia completa de bandas

5. Avisos y Precauciones

El Bromuro de Etidio es una sustancia mutagénica potente. ¡Usar guantes cuando se manejen geles o soluciones que contengan EtBr! ¡Tenga en cuenta las instrucciones de uso, avisos y precauciones del fabricante! El transiluminador emite ondas muy cortas de luz UV que puede causar quemaduras en piel y retina. ¡Usar una máscara de seguridad!

El material biológico que se utiliza para la extracción de ADN, p. ej., sangre o tejidos humanos, se deben tratar como potencialmente infecciosos. Cuando se manipula material biológico se recomienda observar las debidas medidas de seguridad (no pipetear con la boca; usar guantes

ROQUE L. ESPINOSA
Biotecnológico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
E/a ANDRÉS SANTÍN
DNI 26 644.967
SOCIO GERENTE




desechables durante la manipulación material biológico y la realización de la prueba; desinfectar las manos cuando haya terminado la prueba).

El material biológico se debe desactivar antes de desechar (por ejemplo en un autoclave). Los materiales desechables se deben esterilizar o incinerar después de utilizarlos.

Los derrames de materiales potencialmente infecciosos se deben eliminar inmediatamente con papel absorbente y limpiar las zonas contaminadas con un desinfectante estándar adecuado o de alcohol al 70%. Los materiales que se usan para limpiar derrames, incluyendo guantes, se deben desactivar antes de desecharlos (p. ej. en una autoclave).

El desecho de todas las muestras, reactivos no usados y residuos se debe realizar de acuerdo a las normas nacionales, autonómicas, provinciales y locales.

Las Hojas de Datos de Seguridad de Materiales (MSDS) se pueden descargar en el sitio Web: www.bag-healthcare.com


BOQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315


FELSAN S.R.
Lic. ANDRES SANTIF
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE

6. Troubleshooting

Problema	Posible causa	Solución
no amplificación, estándar de longitud visible	ADN contaminado con inhibidores de PCR	Repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos
	Concentración de ADN demasiado alta/demasiado baja	Cambiar concentración del ADN, repetir extracción de ADN
	No hay enzima o concentración demasiado baja	Repetir tipaje, cambiar concentración del ADN
	ADN de sangre heparinizada	Repetir tipaje, sangre EDTA o citrato
	Parámetros de amplificación incorrectos	optimizar los parametros de amplificación (ver 4.3) ☆
fallo repetitivo en calles aisladas (no control de amplificación)	Agujero en los tubos de reacción; pérdida de agua y cambio de concentración durante la PCR	cerrar fuerte los tubos con los tapones
amplificación inespecífica, bandas adicionales, (bandas adicionales de tamaño incorrecto deben ser olvidadas)	contaminación con productos de amplificación	Repetir tipaje, asegurar funcionamiento exacto
	ADN contaminado con sales	Repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos
	Concentración de ADN demasiado alta	usar menos ADN
	Concentración de enzima demasiado alta	usar menos enzima
	Parámetros de amplificación incorrectos	optimizar los parametros de amplificación (ver 4.3) ☆
La evaluación muestra más de 2 especificidades	Contaminación por arrastre (productos de amplificación!) Nuevo alelo	comprobar mezclas de tipado (ADN no añadido) asegurar funcionamiento exacto
Ninguna o sólo bandas débiles visibles, estándar de longitud invisible	tinción con EtBr demasiado débil	repetir teñido
el fondo del gel tiene demasiado brillo	la tinción fue duró demasiado, concentración de EtBr demasiado alta	sumergir el gel en H ₂ O o TBE disminuir la concentración de EtBr
bandas borrosas	tampón de electroforesis demasiado caliente o agotado, tampón de electroforesis incorrecto, mala polimerización del gel	disminuir el voltaje usar tampón TBE 0,5x

☆ Cuando se usan equipamientos y materiales listados, la optimización de los parámetros de amplificación se debería buscar sólo como un último recurso. En la mayoría de los casos, es posible evaluar la prueba eliminando las bandas adicionales causadas por discrepancia en el tamaño.

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









Additional references see www.bag-healthcare.com.


 ROQUE L. ESPINOSA
 Bioquímico
 N.N. 9315


 FELSAN S.R.L.
 Lic. ANDRÉS SANTÍN
 DNI 26 644.967
 SOCIO GERENTE



8 SIMBOLOS UTILIZADOS EN EL RÓTULO

	Condiciones de conservación. Rango de Temperatura
	Temperatura de almacenamiento / Límite inferior de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Consulte las instrucciones de uso/Manual de instrucciones
	Contiene suficiente para n unidades de análisis
	Establecimiento elaborador
	Para uso diagnóstico in vitro
	Número de catálogo

Fabricante
BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich / Alemania

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 – C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Luis Espinosa
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro Nro PM-1544-7

Manual de instrucciones en otros idiomas:
<http://www.bag-healthcare.com>
<http://service.bag-healthcare.com>
or phone: +49 (0)6404-925-125

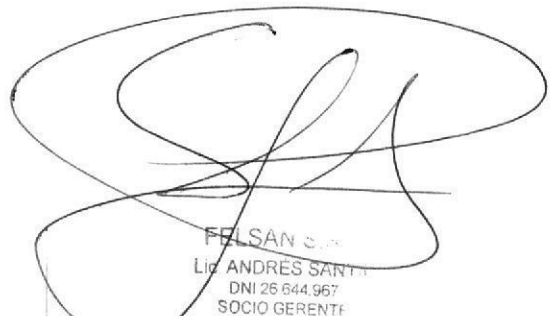


BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany
Tel.: +49 (0) 6404/925-0
Fax: +49 (0) 6404/925-250
www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404/925-450
Fax: +49 (0) 6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404/925-125
Fax: +49 (0) 6404/925-421
service@bag-healthcare.com


ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315


FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SAN MARTÍN
DNI: 26.644.967
SOCIO GERENTE

EN

Instrucciones de uso

BAGene SSP Kits

Ver manual de instrucciones en formato digital: www.bag-healthcare.com

X IVD

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

Listo para usar pre-alicuotadas

REF 6640	ABO-TYPE
REF 6641	ABO-TYPE variant
REF 6645	RH-TYPE
REF 6646	Partial D-TYPE
REF 6647	Weak D-TYPE
REF 6648	D Zygotity-TYPE
REF 6650	KKD-TYPE
REF 6652	MNS-TYPE
REF 6653	Rare-TYPE
REF 6660	HPA-TYPE
REF 66701	HNA-TYPE

Contents

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

ROQUE L. ESPINOSA
 Bioquímico
 M.N. 9315

FELSAIN
 Lic. ANDRES S.
 DNI 26 644 96
 SOCIO GERENT

1. Descripción del producto

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

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



Fig. 1 Principios SSP-PCR

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

2. Materiales

2.1. Contenido de BAGene kits

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

2.2. Material requerido pero no incluido.

- ◆ Happy Taq (REF 70976) (u otra Taq Polimerasa, validad con el BAGene kits por el usuario).
El Happy Taq se suministra sin cargo con la compra del BAGene Kit.
No usar una Hot-start Taq Polimerasa (ej. Ampli Taq Gold)!
- ◆ EXTRA GENE I kit (REF 7059) (opcional) para extracción de AND a partir de sangre/linfocitos/ leucocitos o material para otros métodos de extracción de AND
- ◆ Pipetas piston (0.5 - 250 µl)
- ◆ Tips estériles con filtro integrado
- ◆ Termociclador (Ver pág. 6 lista de termocicladores validados)
- ◆ AND agarosa
- ◆ 0.5x TBE buffer (45 mM de Tris, 45 mM ácido bórico, 0.5 mM de EDTA)
- ◆ Bromuro de Etidio (BrEt)
- ◆ Unidad submarina de electroforesis

RODRIGUEZ ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

EL SAN...
Lic. ANDRÉS SANTI
DNI 26.044.967
SOCIO GERENTE



- ◆ Fuente de energía (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ DNA-length standard (REF 7097)
- ◆ Fuente de UV (Transiluminador, 220-310 nm)
- ◆ Sistema de documentación de Gel.

2.3. Almacenamiento y Estabilidad

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

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

3. Datos de desempeño

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

La precisión y reproducibilidad de cada mezcla de primers específica fueron verificadas para cada lote con muestras de AND control con especificidades conocidas.

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

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

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

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

Se garantiza una tipificación confiable utilizando de 50 - 100 ng de ADN per reaction mix.

D Zygoty-TYPE representa una excepción a esto debido a un programa más largo de PCR, por lo que para este producto se debe utilizar una concentración menor de ADN de 30 - 50 ng por mezcla de reacción

4. Procedimiento de prueba

4.1. Condiciones de seguridad y observaciones especiales

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

ROQUEL ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSA...
Lic. ANDRÉS SANTI...
DNI 26.044.987
SOCIO GERENTE



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

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

4.2. Extracción de ADN

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

Métodos validados para la extracción de ADN:

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

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

El ADN debería tener los siguientes índices de pureza:

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

4.3. Amplificación

Todas las mezclas de reacción prealicutadas ya contienen "primers" específicos de alelos y controles y nucleótidos. Estos se suministran secos en el fondo del tubo de reacción. Los parámetros de amplificación están optimizados para un volumen final de 10 μ l.

1. Tomar de los "kits" el número de placas/tiras de $\leq -20^{\circ}\text{C}$ y descongelar el tampón de PCR 10x.
2. Pipetear la Master-Mix formada por tampón de PCR 10x, solución de ADN, Taq-Polimerasa y H₂O destilada y mezclar bien. Los diferentes "kits" BAGene funcionan con la misma Master-Mix y por lo tanto se pueden combinar, excepto el "kit" D Zygosity-TYPE para el que se recomienda otra concentración de ADN. La composición de la Master-Mix se muestra en la Tabla 1.


ROQUE ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315


FELISA SANTILLÁN
LIC. ANDRÉS SANTILLÁN
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



Tabla 1: Composición de la Master-Mix dependiendo del No de mezclas de reacción:

No. de mezclas	Agua Dest.	10x PCR buffer	Solución ADN (50-100 ng/μl) ♦	Happy Taq (5 U/μl)	Volumen total
1	8	1	1	0,08	10 μl
2	16	2	2	0,2	20 μl
6☆	50	7	7	0,5	65 μl
7	70	9	9	0,7	90 μl
8	80	10	10	0,8	100 μl
9	88	11	11	0,9	110 μl
10	96	12	12	1,0	120 μl
11	104	13	13	1,0	130 μl
12	112	14	14	1,1	140 μl
13	128	16	16	1,3	160 μl
14	136	17	17	1,4	170 μl
15	144	18	18	1,4	180 μl
16	152	19	19	1,5	190 μl
18	166	21	21	1,7	210 μl

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

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

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

♦ Para el "kit" D Zygosity-TYPE se recomienda una concentración de ADN de 30 – 50 ng/μl.

3. Tras agitar en el vortex, añadir 10 μl de esta mezcla inmediatamente a las mezclas precargadas y secas. Cambiar de punta tras cada paso de pipeteo. Cerrar los tubos fuerte con sus respectivos tapones o con una lámina adhesiva. Asegurarse de no tocar con los dedos la parte interior de los tapones o los bordes superiores de los tubos para evitar contaminaciones. Si se usan termocicladores con tapa de ajuste fuerte, también es posible usar alfombrillas de PCR reutilizables. Agitar ligeramente la placa para disolver el pellet del fondo del tubo. Toda la solución de PCR debe quedarse en el fondo. Si fuera necesario la placa debería ser centrifugada un instante.

4. Colocar los tubos de reacción con firmeza en el termociclador y apretar bien la tapa para que los tubos no se deformen con el calor. Iniciar el programa de PCR. ¡¡No es necesario recubrir las mezclas de reacción con aceite mineral si se usa una tapa caliente y ajustada!!

Marcando →	Nro lote.	
Mezcla de reacción →	①	⑨
	②	⑩
	③	.
	④	.
	⑤	.
	⑥	.
	⑦	.
	⑧	.

ROQUE ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTINI
DNI 25.644.967
SOCIO GERENTE



Parámetros de Amplificación para todos los kits BAGene excepto D Zygosity-TYPE

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

Validated Thermal Cyclers

PTC 200 / C1000

(MJ Research/ BioRad),
GeneAmp PCR-System
9700 (usar tasa de
calentamiento del 9600)
(ABI),

Mastercycler epGradient
S (usar la función
"simular gradiente de
Mastercycler")
(Eppendorf)

Tprofessional (Biometra)

!!! ATENCIÓN: Programa de PCR diferente !!! Parámetros de Amplificación para D Zygosity-TYPE

Programa-Paso	Tiempo	Temp.	No. De Ciclos
Desnat. Inicial	10 Min	95°C	1 Ciclo
Desnaturalización	20 Sec	92°C	35 Ciclos
Anilamiento	30 Sec	64°C	
Extension	5 Min	68°C	
Extension Final	5 Min	72°C	1 Ciclo

Termocicladores Validados

Ver parámetros de
amplificación para otros
BAGene kits

!! No usar bloques térmicos de aluminio (p.ej.: GeneAmp PCR-System 9700) !!

Cuando se usen termocicladores con tasas muy rápidas de calentamiento y enfriamiento, se recomienda usar una rampa térmica reducida (~ 2.5°C/seg).

Dado que los termocicladores de diferentes fabricantes rinden de manera distinta e incluso máquinas individuales de un tipo pueden estar calibradas diferentemente, puede ser necesario optimizar los parámetros de amplificación.

Para optimizar un termociclador usar la siguiente guía:

Si hay **reacciones falsas positivas** (bandas inespecíficas, tipos adicionales), aumentar la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C.

Si hay **reacciones falsas negativas** (bandas y/o controles de amplificación desaparecidos), disminuir la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C y/o aumentar los tiempos de anillamiento en pasos de 5 segundos y/o aumentar los tiempos de desnaturalización en pasos de 5 segundos

Se recomienda usar exclusivamente termocicladores calibrados con regularidad. El "kit" CYCLER CHECK (REF 7104) es muy adecuado para este fin.

ROQUE ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

6 of 12

FELSÁN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTÍN
DNI 25.644.967
SOCIO GERENTE



4.4. Electroforesis en GEL

La separación de los productos de amplificación se realiza usando un gel (horizontal) de agarosa. Como tampón para la electroforesis, se recomienda TBE 0,5x (45 mM de tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA). La concentración del gel debe ser del 2,0 – 2,5% de agarosa. Dejar polimerizar el gel al menos 30 minutos antes de cargar las muestras.

Al terminar la amplificación, sacar las muestras del termociclador y cargar cuidadosamente todas las muestras de reacción completas en cada pocillo del gel. Además, aplicar 10µl de un estándar de longitud de ADN para comparar los tamaños. La separación electroforética se hace a 10 - 12 V/cm (con una distancia de unos 20 cm entre los electrodos, aprox. 200 - 240V), durante 20 - 40 minutos. Se recomiendan 40 minutos para mejorar la separación de las bandas al usar D Zygoty-TYPE. Tras finalizar, se tiñe el gel completo en una solución de Bromuro de Etidio (EtBr) (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr en H₂O o tampón TBE) durante 30 - 40 minutos. Como alternativa, el EtBr (0,5 µg/ml) se puede añadir al tampón de electroforesis o al gel de agarosa. Si fuese necesario, se puede eliminar el exceso de EtBr empapando el gel en H₂O o en tampón TBE 0,5x durante 20 - 30 minutos.

4.5. Documentación

Para la documentación, visualizar el amplificado de la PCR usando un transiluminador UV (220 - 310nm) y un sistema adecuado de documentación de geles. Elegir el tiempo de exposición y la apertura de tal manera que las bandas se vean nítidas y destaquen frente al fondo oscuro (apertura aproximada 11, tiempo de exposición 1 segundo). Los resultados se documentan en la hoja de tareas suministrada (ver punto 4.6)

4.6. Interpretación de resultados y limitaciones del método

4.6.1. General

Los resultados obtenidos con los "kits" BAGene son documentados en las hojas de tareas suministradas. En las hojas de tareas están listadas en una tabla todas las características, especificidades, fenotipos y genotipos, y un ejemplo de patrón de reacción sirve como apoyo a la interpretación. Las preparaciones de PCR tiene números de reacción (p.ej.: ABO-TYPE reacción no 1 - 8). La longitud del fragmento de ADN se indica en bp bajo los números de reacción en la hoja de tareas. Se muestran posibles patrones de bandas del gel en las líneas de abajo. Los productos específicos de PCR (reacciones positivas) se designan como "+" y los cuadros correspondientes del diagrama tienen un fondo coloreado. Los "kits" ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygoty-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, HPA-TYPE y HNA-TYPE están resaltados en **gris**, RH-TYPE additional en **rojo, verde y azul**. La evaluación de los patrones de reacción se lleva a cabo en las líneas de izquierda a derecha.

Sólo se deben considerar positivas las bandas que tengan el tamaño correcto en comparación con el estándar de longitud de ADN. Los tamaños correctos vienen en las hojas de trabajo. En todas las calles sin amplificación específica de alelo, se debe ver claramente una banda de **434bp** del control interno. Son excepciones **D Zygoty-TYPE** y la reacción de PCR con no2 de mezcla de **RH-TYPE** que muestra un control interno de **659bp**. ¡En la mayoría de los casos con una amplificación específica de alelo la banda del control interno es más débil o incluso desaparece completamente!. Si no hay una banda específica y no aparece la banda de control interno, el resultado con la mezcla relevante no puede ser usado para la evaluación.

Para resultados inapropiados ver resolución de problemas (punto 6).

Si no se pudiera obtener un resultado claro con los "kits" BAGene (p.ej.: debido a alelos desconocidos que no se pueden detectar con los "primers" existentes), se deben seguir las normas nacionales de transfusión en concordancia con los tipajes serológicos. Se recomienda el análisis de esas muestras por secuenciación. Los resultados de tipaje se deben interpretar

ROQUE L. ASPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

7 of 12

Lic. ANDRÉS SANTIK
DNI 25.014.907
SOCIO GERENTE

teniendo en cuenta la varianza genética de los diferentes grupos étnicos. En caso de duda el fenotipo es válido.



4.6.2. Kits ABO-TYPE y ABO-TYPE variant

La expresión homocigota de los alelos ABO*O01, ABO*O03, ABO*B101, ABO*A201 se indica por medio de las bandas en la correspondiente reacción de PCR (1, 3, 5, ó 7). En heterocigosis todas las cuatro "no-reacciones" tienen que tener una banda en el gel (2, 4, 6, y 8) además de dos preparaciones específicas de PCR (1, 3, 5, 7). La homocigosis del alelo ABO*A101 se indica sólo por bandas en todas las cuatro "no-reacciones" (2, 4, 6, 8), dado que no hay ninguna preparación específica para ABO*A101. La constelación de heterocigosis de ABO*A101 se puede reconocer por una banda adicional de las reacciones específicas de alelo (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16).

Dado que sólo una selección de alelos de la *variante A* pueden ser detectados por el "kit" ABO-TYPE variant, otros alelos de la *variante A* pueden estar ocultos por el resultado de PCR **ABO*A101**. Dado que sólo una selección de alelos de la *variante B* y ningún alelo de la *variante A²* pueden ser detectados por el "kit" ABO-TYPE variant, otros alelos de las *variantes B* o *A²* pueden estar ocultos por los resultados de PCR **ABO*B101** y **ABO*A201** respectivamente. La mayoría de los alelos *B^(A)* y *cis AB* también muestran un resultado positivo en la reacción ABO*B101.

Aparece una banda específica para la HGH con una longitud de 434 bp como control interno..

Consultar también las observaciones especiales en las hojas de tareas de los "kits" ABO-TYPE y ABO-TYPE variant.



4.6.3. Kit RH-TYPE

La determinación molecular de RHD estándar así como de algunas variantes RHD (haplotipos RHD positivos en especímenes negativos para D serológicamente, D parcial) son realizados en reacciones designadas de PCR.


Las preparaciones 1 y 2 son reacciones de PCR Múltiple para examinar 5 polimorfismos de RHD (intrón 4 y 7 de RHD, exón 7, así como la detección específica de RHD (W16X) y RHDΨ). Esto significa que, en contraste con todos los otros "kits" BAGene (excepto para la banda del control interno) no sólo uno, sino también pueden aparecer dos amplicones en una reacción de PCR. Para facilitar la evaluación, los cuadros respectivos están divididos cuando pueden aparecer dos bandas posibles y tienen un fondo bicolor. Las longitudes de los fragmentos de los productos de PCR y los polimorfismos están identificados también con un color específico según los cuadros del patrón de reacción.

Ejemplo RHDΨ:

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

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


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

- Producto de PCR: 154 bp – identificación roja, patrón de reacción en cuadro fondo rojo 

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S.P.A.
Lic. ANDRÉS SANTIN
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



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

Las reacciones de PCR designadas se usan para la determinación genética molecular de las características del locus del gen RHCE. Aparece una banda con una longitud de 434bp, específica para la HGH como control interno. Excepción: la reacción de PCR no 2 donde aparece una banda control de 659bp (secuencia genómica del cromosoma I, 90 kbp 5' de la Caja Rhesus).

Si el patrón de reacción indica una categoría D, se puede realizar un examen posterior usando el "kit" Partial D-TYPE para excluir mutaciones puntuales como una causa de estos resultados.

4.6.4. Kit Partial D-TYPE

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

Actualmente no es posible la diferenciación genética molecular del *RHD* estándar de las variantes de D: **DCS**, **DFW**, **DIM**, **DNU**. La consideración de los haplotipos es útil.

4.6.5. D Zygotity-TYPE

Para alelos *RHD*, que no pueden ser determinados serológicamente (RhD neg.), puede suceder una discrepancia entre los resultados de la prueba serológica y el genotipado. La detección positiva de la *Caja Rhesus* "Downstream" muestra la presencia de un alelo *RHD* (*RHD* pos.), excepto *RHD* Ψ homocigotos y hemizigotos respectivamente. La reacción aquí resultante es negativa aunque un alelo *RHD* esté presente.

Además, el resultado con una *Caja Rhesus* "Downstream" genéticamente modificada puede ser también falsa negativa, aunque el espécimen sea serológicamente D-positivo. Por tanto, con un resultado positivo para D serológicamente y PCR positiva para la *Caja Rhesus* Híbrida, el resultado es "Dd." Es "DD" cuando es un resultado negativo de PCR para la *Caja Rhesus* Híbrida. Debido al polimorfismo característico de la *Caja Rhesus* Híbrida de los africanos, puede aparecer un resultado falso positivo en presencia de *RHD* Ψ y otro alelo *RHD*.

En el caso de una *Caja Rhesus* Híbrida perdida en la población negra, los resultados para los alelos *RHD* Ψ y *Cde*^S obtenidos usando **RH-TYPE** tiene que ser considerados. Otros alelos *RHD* con antígeno D negativo no se pueden excluir con los "kits" de pruebas disponibles actualmente. Esto debe ser considerado en la interpretación de los resultados. Sin embargo la incidencia de estos alelos en la población blanca es bastante baja.

El ADN degradado puede producir resultados falsos negativos. Esto se puede observar por la presencia única de las bandas del control interno o por la ausencia completa de bandas

5. Avisos y Precauciones

El Bromuro de Etidio es una sustancia mutagénica potente. ¡Usar guantes cuando se manejen geles o soluciones que contengan EtBr! ¡Tenga en cuenta las instrucciones de uso, avisos y precauciones del fabricante! El transiluminador emite ondas muy cortas de luz UV que puede causar quemaduras en piel y retina. ¡Usar una máscara de seguridad!

El material biológico que se utiliza para la extracción de ADN, p. ej., sangre o tejidos humanos, se deben tratar como potencialmente infecciosos. Cuando se manipula material biológico se recomienda observar las debidas medidas de seguridad (no pipetear con la boca; usar guantes

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

desechables durante la manipulación material biológico y la realización de la prueba; desinfectar las manos cuando haya terminado la prueba).

El material biológico se debe desactivar antes de desechar (por ejemplo en un autoclave). Los materiales desechables se deben esterilizar o incinerar después de utilizarlos.

Los derrames de materiales potencialmente infecciosos se deben eliminar inmediatamente con papel absorbente y limpiar las zonas contaminadas con un desinfectante estándar adecuado o de alcohol al 70%. Los materiales que se usan para limpiar derrames, incluyendo guantes, se deben desactivar antes de desecharlos (p. ej. en una autoclave).

El desecho de todas las muestras, reactivos no usados y residuos se debe realizar de acuerdo a las normas nacionales, autonómicas, provinciales y locales.

Las Hojas de Datos de Seguridad de Materiales (MSDS) se pueden descargar en el sitio Web: www.baq-healthcare.com




ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9345


FELSAN S R L
Lic. ANDRES SANTHI
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



6. Troubleshooting

Problema	Posible causa	Solución
no amplificación, estándar de longitud visible	ADN contaminado con inhibidores de PCR	Repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos
	Concentración de ADN demasiado alta/demasiado baja	Cambiar concentración del ADN, repetir extracción de ADN
	No hay enzima o concentración demasiado baja	Repetir tipaje, cambiar concentración del ADN
	ADN de sangre heparinizada	Repetir tipaje, sangre EDTA o citrato
	Parámetros de amplificación incorrectos	optimizar los parametros de amplificación (ver 4.3) ☆
fallo repetitivo en calles aisladas (no control de amplificación)	Agujero en los tubos de reacción; pérdida de agua y cambio de concentración durante la PCR	cerrar fuerte los tubos con los tapones
amplificación inespecífica, bandas adicionales, (bandas adicionales de tamaño incorrecto deben ser olvidadas)	contaminación con productos de amplificación	Repetir tipaje, asegurar funcionamiento exacto
	ADN contaminado con sales	Repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos
	Concentración de ADN demasiado alta	usar menos ADN
	Concentración de enzima demasiado alta	usar menos enzima
	Parámetros de amplificación incorrectos	optimizar los parametros de amplificación (ver 4.3) ☆
La evaluación muestra más de 2 especificidades	Contaminación por arrastre (productos de amplificación!) Nuevo alelo	comprobar mezclas de tipado (ADN no añadido) asegurar funcionamiento exacto
Ninguna o sólo bandas débiles visibles, estándar de longitud invisible	tinción con EtBr demasiado débil	repetir teñido
el fondo del gel tiene demasiado brillo	la tinción fue duró demasiado, concentración de EtBr demasiado alta	sumergir el gel en H ₂ O o TBE disminuir la concentración de EtBr
bandas borrosas	tampón de electroforesis demasiado caliente o agotado, tampón de electroforesis incorrecto, mala polimerización del gel	disminuir el voltaje usar tampón TBE 0,5x

☆ Cuando se usan equipamientos y materiales listados, la optimización de los parámetros de amplificación se debería buscar sólo como un último recurso. En la mayoría de los casos, es posible evaluar la prueba eliminando las bandas adicionales causadas por discrepancia en el tamaño.

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









Additional references see www.bag-healthcare.com.

ROQUE L. ESPINOSA
Químico
M.N. 9314

FELSAN S.R.
Lic. ANDRÉS SANTI
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



8 SIMBOLOS UTILIZADOS EN EL RÓTULO

	Condiciones de conservación. Rango de Temperatura
	Temperatura de almacenamiento / Límite inferior de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Consulte las instrucciones de uso/Manual de instrucciones
	Contiene suficiente para n unidades de análisis
	Establecimiento elaborador
	Para uso diagnóstico in vitro
	Número de catálogo

Fabricante
BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich / Alemania

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 – C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Luis Espinosa
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro Nro PM-1544-7

Manual de instrucciones en otros idiomas:
<http://www.bag-healthcare.com>
<http://service.bag-healthcare.com>
or phone: +49 (0)6404-925-125




BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany
Tel.: +49 (0) 6404/925-0
Fax: +49 (0) 6404/925- 250
www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404/925-450
Fax: +49 (0) 6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404/925-125
Fax: +49 (0) 6404/925-421
service@bag-healthcare.com


ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315


FELSAN S.R.L.
Lc. ANDRES SANTIN
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



EN

Instrucciones de uso

BAGene SSP Kits

Ver manual de instrucciones en formato digital: www.bag-healthcare.com

X IVD

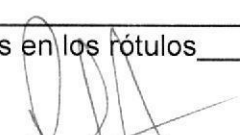
Kits de prueba para determinación de grupo sanguíneo ABO, RH, Kell, sistemas Kidd y Duffy, sistema MNS, sistemas de grupo sanguíneo raros, especificidades HPA y HNA sobre una base de genética molecular


Listo para usar pre-alicuotadas

REF 6640	ABO-TYPE
REF 6641	ABO-TYPE variant
REF 6645	RH-TYPE
REF 6646	Partial D-TYPE
REF 6647	Weak D-TYPE
REF 6648	D Zygotity-TYPE
REF 6650	KKD-TYPE
REF 6652	MNS-TYPE
REF 6653	Rare-TYPE
REF 6660	HPA-TYPE
REF 66701	HNA-TYPE

Contents

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


ROQUI L. ESPINOSA
 Bioquímico
 M.N. 9345


FELSAN S.R.L.
 Lic. ANDRÉS SANTÍN
 DNI 26 644 967
 SOCIO GERENTE



1. Descripción del producto

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

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

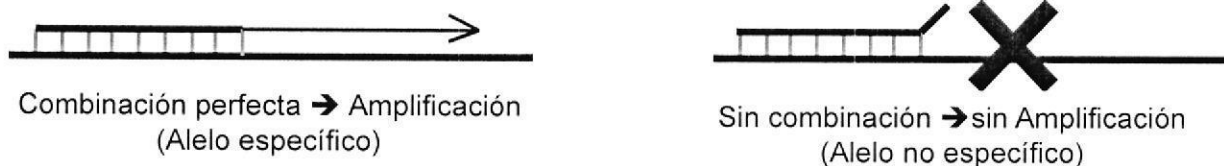


Fig. 1 Principios SSP-PCR

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

2. Materiales

2.1. Contenido de BAGene kits

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

2.2. Material requerido pero no incluido.

- ◆ Happy Taq (REF 70976) (u otra Taq Polimerasa, validad con el BAGene kits por el usuario).
El Happy Taq se suministra sin cargo con la compra del BAGene Kit.
No usar una Hot-start Taq Polimerasa (ej. Ampli Taq Gold)!
- ◆ EXTRA GENE I kit (REF 7059) (opcional) para extracción de AND a partir de sangre/linfocitos/ leucocitos o material para otros métodos de extracción de AND
- ◆ Pipetas piston (0.5 - 250 µl)
- ◆ Tips estériles con filtro integrado
- ◆ Termociclador (Ver pág. 6 lista de termocicladores validados)
- ◆ AND agarosa
- ◆ 0.5x TBE buffer (45 mM de Tris, 45 mM ácido bórico, 0.5 mM de EDTA)
- ◆ Bromuro de Etidio (BrEt)
- ◆ Unidad submarina de electroforesis

TOCNEK ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSA S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTÍN
D.N. 20.944.967
SOCIO GERENTE



- ◆ Fuente de energía (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ DNA-length standard (REF 7097)
- ◆ Fuente de UV (Transiluminador, 220-310 nm)
- ◆ Sistema de documentación de Gel.

2.3. Almacenamiento y Estabilidad

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

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

3. Datos de desempeño

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

La precisión y reproducibilidad de cada mezcla de primers específica fueron verificadas para cada lote con muestras de AND control con especificidades conocidas.

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

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

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

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

Se garantiza una tipificación confiable utilizando de 50 - 100 ng de ADN per reaction mix.

D Zygoty-TYPE representa una excepción a esto debido a un programa más largo de PCR, por lo que para este producto se debe utilizar una concentración menor de ADN de 30 - 50 ng por mezcla de reacción

4. Procedimiento de prueba

4.1. Condiciones de seguridad y observaciones especiales

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

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

EL SAN S.R.L.
LIC. ANDRÉS SANTI
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE

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



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

4.2. Extracción de ADN

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

Métodos validados para la extracción de ADN:

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

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

El ADN debería tener los siguientes índices de pureza:

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

4.3. Amplificación

Todas las mezclas de reacción prealiquotadas ya contienen "primers" específicos de alelos y controles y nucleótidos. Estos se suministran secos en el fondo del tubo de reacción. Los parámetros de amplificación están optimizados para un volumen final de 10 μ l.

1. Tomar de los "kits" el número de placas/tiras de $\leq -20^{\circ}\text{C}$ y descongelar el tampón de PCR 10x.
2. Pipetear la Master-Mix formada por tampón de PCR 10x, solución de ADN, Taq-Polimerasa y H₂O destilada y mezclar bien. Los diferentes "kits" BAGene funcionan con la misma Master-Mix y por lo tanto se pueden combinar, excepto el "kit" D Zygotity-TYPE para el que se recomienda otra concentración de ADN. La composición de la Master-Mix se muestra en la Tabla 1.

FELSAN S
Lic. ANDRES SANTIF
DNI 26 644 967
SOCIO GERENTE



Tabla 1: Composición de la Master-Mix dependiendo del No de mezclas de reacción:

No. de mezclas	Agua Dest.	10x PCR buffer	Solución ADN (50-100 ng/μl) ♣	Happy Taq (5 U/μl)	Volumen total
1	8	1	1	0,08	10 μl
2	16	2	2	0,2	20 μl
6☆	50	7	7	0,5	65 μl
7	70	9	9	0,7	90 μl
8	80	10	10	0,8	100 μl
9	88	11	11	0,9	110 μl
10	96	12	12	1,0	120 μl
11	104	13	13	1,0	130 μl
12	112	14	14	1,1	140 μl
13	128	16	16	1,3	160 μl
14	136	17	17	1,4	170 μl
15	144	18	18	1,4	180 μl
16	152	19	19	1,5	190 μl
18	166	21	21	1,7	210 μl

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

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

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

♣ Para el "kit" D Zygosity-TYPE se recomienda una concentración de ADN de 30 – 50 ng/μl.

3. Tras agitar en el vortex, añadir 10 μl de esta mezcla inmediatamente a las mezclas precargadas y secas. Cambiar de punta tras cada paso de pipeteo. Cerrar los tubos fuerte con sus respectivos tapones o con una lámina adhesiva. Asegurarse de no tocar con los dedos la parte interior de los tapones o los bordes superiores de los tubos para evitar contaminaciones. Si se usan termocicladores con tapa de ajuste fuerte, también es posible usar alfombrillas de PCR reutilizables. Agitar ligeramente la placa para disolver el pellet del fondo del tubo. Toda la solución de PCR debe quedarse en el fondo. Si fuera necesario la placa debería ser centrifugada un instante.

4. Colocar los tubos de reacción con firmeza en el termociclador y apretar bien la tapa para que los tubos no se deformen con el calor. Iniciar el programa de PCR. ¡¡No es necesario recubrir las mezclas de reacción con aceite mineral si se usa una tapa caliente y ajustada!!

Marcando →	Nro lote.	
Mezcla de	①	⑨
reacción →	②	⑩
	③	.
	④	.
	⑤	.
	⑥	.
	⑦	.
	⑧	.

ROQUE L. ESPINOSA
 Bioquímico
 M.N. 9315

ELSAN S.R.L.
 Lic. ANDRÉS SANTO
 DNI 26.644.967
 SOCIO GERENTE

Parámetros de Amplificación para todos los kits BAGene excepto D Zygosity-TYPE

Programa-Paso	Tiempo	Temp.	No. De Ciclos	Validated Thermal Cyclers
Desnat. Inicial	5 Min	96°C	1 Ciclo	PTC 200 / C1000 (MJ Research/ BioRad), GeneAmp PCR-System 9700 (usar tasa de calentamiento del 9600) (ABI),
Desnaturalización	10 Sec	96°C	5 Ciclos	
Anilamiento+Extension	60 Sec	70°C		10 Ciclos
Desnaturalización	10 Sec	96°C		
Anilamiento	50 Sec	65°C		
Extension	45 Sec	72°C	15 Ciclos	Mastercycler epGradient S (usar la función "simular gradiente de Mastercycler") (Eppendorf)
Desnaturalización	10 Sec	96°C		
Anilamiento	50 Sec	61°C		
Extension	45 Sec	72°C	1 Ciclo	
Extension Final	5 Min	72°C		

● Tprofessional (Biometra)

!!! ATENCIÓN: Programa de PCR diferente !!!
Parámetros de Amplificación para D Zygosity-TYPE

Programa-Paso	Tiempo	Temp.	No. De Ciclos	Termocicladores Validados
Desnat. Inicial	10 Min	95°C	1 Ciclo	Ver parámetros de amplificación para otros BAGene kits
Desnaturalización	20 Sec	92°C	35 Ciclos	
Anilamiento	30 Sec	64°C		
Extension	5 Min	68°C		
Extension Final	5 Min	72°C	1 Ciclo	


● **¡¡ No usar bloques térmicos de aluminio (p.ej.: GeneAmp PCR-System 9700) !!**
 Cuando se usen termocicladores con tasas muy rápidas de calentamiento y enfriamiento, se recomienda usar una rampa térmica reducida (~ 2.5°C/seg).
 Dado que los termocicladores de diferentes fabricantes rinden de manera distinta e incluso máquinas individuales de un tipo pueden estar calibradas diferentemente, puede ser necesario optimizar los parámetros de amplificación.

Para optimizar un termociclador usar la siguiente guía:

Si hay **reacciones falsas positivas** (bandas inespecíficas, tipos adicionales), aumentar la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C.

Si hay **reacciones falsas negativas** (bandas y/o controles de amplificación desaparecidos), disminuir la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C y/o aumentar los tiempos de anillamiento en pasos de 5 segundos y/o aumentar los tiempos de desnaturalización en pasos de 5 segundos

Se recomienda usar exclusivamente termocicladores calibrados con regularidad. El "kit" CYCLER CHECK (REF 7104) es muy adecuado para este fin.


 ROQUE L. ESPINOSA
 Bioquímico
 M.N. 9315


 LIC. ANDRÉS SANTINI
 DNI 26.644.987
 SOCIO GERENTE



4.4. Electroforesis en GEL

La separación de los productos de amplificación se realiza usando un gel (horizontal) de agarosa. Como tampón para la electroforesis, se recomienda TBE 0,5x (45 mM de tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA). La concentración del gel debe ser del 2,0 – 2,5% de agarosa. Dejar polimerizar el gel al menos 30 minutos antes de cargar las muestras.

Al terminar la amplificación, sacar las muestras del termociclador y cargar cuidadosamente todas las muestras de reacción completas en cada pocillo del gel. Además, aplicar 10µl de un estándar de longitud de ADN para comparar los tamaños. La separación electroforética se hace a 10 - 12 V/cm (con una distancia de unos 20 cm entre los electrodos, aprox. 200 - 240V), durante 20 - 40 minutos. Se recomiendan 40 minutos para mejorar la separación de las bandas al usar D Zygoty-TYPE. Tras finalizar, se tiñe el gel completo en una solución de Bromuro de Etidio (EtBr) (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr en H₂O o tampón TBE) durante 30 - 40 minutos. Como alternativa, el EtBr (0,5 µg/ml) se puede añadir al tampón de electroforesis o al gel de agarosa. Si fuese necesario, se puede eliminar el exceso de EtBr empapando el gel en H₂O o en tampón TBE 0,5x durante 20 - 30 minutos.

4.5. Documentación

Para la documentación, visualizar el amplificado de la PCR usando un transiluminador UV (220 - 310nm) y un sistema adecuado de documentación de geles. Elegir el tiempo de exposición y la apertura de tal manera que las bandas se vean nítidas y destaquen frente al fondo oscuro (apertura aproximada 11, tiempo de exposición 1 segundo). Los resultados se documentan en la hoja de tareas suministrada (ver punto 4.6)

4.6. Interpretación de resultados y limitaciones del método

4.6.1. General

Los resultados obtenidos con los "kits" BAGene son documentados en las hojas de tareas suministradas. En las hojas de tareas están listadas en una tabla todas las características, especificidades, fenotipos y genotipos, y un ejemplo de patrón de reacción sirve como apoyo a la interpretación. Las preparaciones de PCR tiene números de reacción (p.ej.: ABO-TYPE reacción no 1 - 8). La longitud del fragmento de ADN se indica en bp bajo los números de reacción en la hoja de tareas. Se muestran posibles patrones de bandas del gel en las líneas de abajo. Los productos específicos de PCR (reacciones positivas) se designan como "+" y los cuadros correspondientes del diagrama tienen un fondo coloreado. Los "kits" ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygoty-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, HPA-TYPE y HNA-TYPE están resaltados en **gris**, RH-TYPE additional en **rojo, verde y azul**. La evaluación de los patrones de reacción se lleva a cabo en las líneas de izquierda a derecha.

Sólo se deben considerar positivas las bandas que tengan el tamaño correcto en comparación con el estándar de longitud de ADN. Los tamaños correctos vienen en las hojas de trabajo. En todas las calles sin amplificación específica de alelo, se debe ver claramente una banda de **434bp** del control interno. Son excepciones **D Zygoty-TYPE** y la reacción de PCR con no2 de mezcla de **RH-TYPE** que muestra un control interno de **659bp**. ¡En la mayoría de los casos con una amplificación específica de alelo la banda del control interno es más débil o incluso desaparece completamente!. Si no hay una banda específica y no aparece la banda de control interno, el resultado con la mezcla relevante no puede ser usado para la evaluación.

Para resultados inapropiados ver resolución de problemas (punto 6).

Si no se pudiera obtener un resultado claro con los "kits" BAGene (p.ej.: debido a alelos desconocidos que no se pueden detectar con los "primers" existentes), se deben seguir las normas nacionales de transfusión en concordancia con los tipajes serológicos. Se recomienda el análisis de esas muestras por secuenciación. Los resultados de tipaje se deben interpretar

ROQUEL ESPINOZA
Bioquímico
M.N. 9315

ED SAN S R L
Lic. ANDRÉS SANTIN
DNI 26 644 967
SOCIO GERENTE

teniendo en cuenta la varianza genética de los diferentes grupos étnicos. En caso de duda, el fenotipo es válido.

4.6.2. Kits ABO-TYPE y ABO-TYPE variant

La expresión homocigota de los alelos ABO*O01, ABO*O03, ABO*B101, ABO*A201 se indica por medio de las bandas en la correspondiente reacción de PCR (1, 3, 5, ó 7). En heterocigosis todas las cuatro "no-reacciones" tienen que tener una banda en el gel (2, 4, 6, y 8) además de dos preparaciones específicas de PCR (1, 3, 5, 7). La homocigosis del alelo ABO*A101 se indica sólo por bandas en todas las cuatro "no-reacciones" (2, 4, 6, 8), dado que no hay ninguna preparación específica para ABO*A101. La constelación de heterocigosis de ABO*A101 se puede reconocer por una banda adicional de las reacciones específicas de alelo (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16).

Dado que sólo una selección de alelos de la variante A pueden ser detectados por el "kit" ABO-TYPE variant, otros alelos de la variante A pueden estar ocultos por el resultado de PCR ABO*A101. Dado que sólo una selección de alelos de la variante B y ningún alelo de la variante A² pueden ser detectados por el "kit" ABO-TYPE variant, otros alelos de las variantes B o A² pueden estar ocultos por los resultados de PCR ABO*B101 y ABO*A201 respectivamente. La mayoría de los alelos B^(A) y cis AB también muestran un resultado positivo en la reacción ABO*B101.

Aparece una banda específica para la HGH con una longitud de 434 bp como control interno..

Consultar también las observaciones especiales en las hojas de tareas de los "kits" ABO-TYPE y ABO-TYPE variant.



4.6.3. Kit RH-TYPE

La determinación molecular de RHD estándar así como de algunas variantes RHD (haplotipos RHD positivos en especímenes negativos para D serológicamente, D parcial) son realizados en reacciones designadas de PCR.


Las preparaciones 1 y 2 son raciones de PCR Múltiple para examinar 5 polimorfismos de RHD (intrón 4 y 7 de RHD, exón 7, así como la detección específica de RHD (W16X) y RHDΨ). Esto significa que, en contraste con todos los otros "kits" BAGene (excepto para la banda del control interno) no sólo uno, sino también pueden aparecer dos amplicones en una reacción de PCR. Para facilitar la evaluación, los cuadros respectivos están divididos cuando pueden aparecer dos bandas posibles y tienen un fondo bicolor. Las longitudes de los fragmentos de los productos de PCR y los polimorfismos están identificados también con un color específico según los cuadros del patrón de reacción.

Ejemplo RHDΨ:

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


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

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

- Producto de PCR: 154 bp – identificación roja, patrón de reacción en cuadro fondo rojo 

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTIN
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE

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



Las reacciones de PCR designadas se usan para la determinación genética molecular de las características del locus del gen RHCE. Aparece una banda con una longitud de 434bp, específica para la HGH como control interno. Excepción: la reacción de PCR no 2 donde aparece una banda control de 659bp (secuencia genómica del cromosoma I, 90 kbp 5' de la Caja Rhesus).

Si el patrón de reacción indica una categoría D, se puede realizar un examen posterior usando el "kit" Partial D-TYPE para excluir mutaciones puntuales como una causa de estos resultados.

4.6.4. Kit Partial D-TYPE

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

Actualmente no es posible la diferenciación genética molecular del *RHD* estándar de las variantes de D: **DCS**, **DFW**, **DIM**, **DNU**. La consideración de los haplotipos es útil.

4.6.5. D Zygotity-TYPE

Para alelos *RHD*, que no pueden ser determinados serológicamente (RhD neg.), puede suceder una discrepancia entre los resultados de la prueba serológica y el genotipado. La detección positiva de la *Caja Rhesus* "Downstream" muestra la presencia de un alelo *RHD* (*RHD* pos.), excepto *RHD* Ψ homocigotos y hemizigotos respectivamente. La reacción aquí resultante es negativa aunque un alelo *RHD* esté presente.

Además, el resultado con una *Caja Rhesus* "Downstream" genéticamente modificada puede ser también falsa negativa, aunque el espécimen sea serológicamente D-positivo. Por tanto, con un resultado positivo para D serológicamente y PCR positiva para la *Caja Rhesus* Híbrida, el resultado es "Dd." Es "DD" cuando es un resultado negativo de PCR para la *Caja Rhesus* Híbrida. Debido al polimorfismo característico de la *Caja Rhesus* Híbrida de los africanos, puede aparecer un resultado falso positivo en presencia de *RHD* Ψ y otro alelo *RHD*.

En el caso de una *Caja Rhesus* Híbrida perdida en la población negra, los resultados para los alelos *RHD* Ψ y *Cde*^S obtenidos usando **RH-TYPE** tiene que ser considerados. Otros alelos *RHD* con antígeno D negativo no se pueden excluir con los "kits" de pruebas disponibles actualmente. Esto debe ser considerado en la interpretación de los resultados. Sin embargo la incidencia de estos alelos en la población blanca es bastante baja.

El ADN degradado puede producir resultados falsos negativos. Esto se puede observar por la presencia única de las bandas del control interno o por la ausencia completa de bandas

5. Avisos y Precauciones

El Bromuro de Etidio es una sustancia mutagénica potente. ¡Usar guantes cuando se manejen geles o soluciones que contengan EtBr! ¡Tenga en cuenta las instrucciones de uso, avisos y precauciones del fabricante! El transiluminador emite ondas muy cortas de luz UV que puede causar quemaduras en piel y retina. ¡Usar una máscara de seguridad!

El material biológico que se utiliza para la extracción de ADN, p. ej., sangre o tejidos humanos, se deben tratar como potencialmente infecciosos. Cuando se manipula material biológico se recomienda observar las debidas medidas de seguridad (no pipetear con la boca; usar guantes

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

PELSAN S R L
Lic. ANDRÉS SANTIV
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



desechables durante la manipulación material biológico y la realización de la prueba; desinfectar las manos cuando haya terminado la prueba).

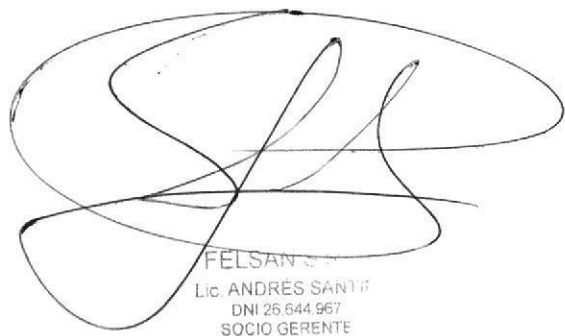
El material biológico se debe desactivar antes de desechar (por ejemplo en un autoclave). Los materiales desechables se deben esterilizar o incinerar después de utilizarlos.

Los derrames de materiales potencialmente infecciosos se deben eliminar inmediatamente con papel absorbente y limpiar las zonas contaminadas con un desinfectante estándar adecuado o de alcohol al 70%. Los materiales que se usan para limpiar derrames, incluyendo guantes, se deben desactivar antes de desecharlos (p. ej. en una autoclave).

El desecho de todas las muestras, reactivos no usados y residuos se debe realizar de acuerdo a las normas nacionales, autonómicas, provinciales y locales.

Las Hojas de Datos de Seguridad de Materiales (MSDS) se pueden descargar en el sitio Web: www.bag-healthcare.com


ROQUE L. ESPINDOSA
Bioquímico
M.N. 9315


FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTILL
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



6. Troubleshooting

Problema	Posible causa	Solución
no amplificación, estándar de longitud visible	ADN contaminado con inhibidores de PCR	Repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos
	Concentración de ADN demasiado alta/demasiado baja	Cambiar concentración del ADN, repetir extracción de ADN
	No hay enzima o concentración demasiado baja	Repetir tipaje, cambiar concentración del ADN
	ADN de sangre heparinizada	Repetir tipaje, sangre EDTA o citrato
	Parámetros de amplificación incorrectos	optimizar los parámetros de amplificación (ver 4.3) ☆
fallo repetitivo en calles aisladas (no control de amplificación)	Agujero en los tubos de reacción; pérdida de agua y cambio de concentración durante la PCR	cerrar fuerte los tubos con los tapones
amplificación inespecífica, bandas adicionales, (bandas adicionales de tamaño incorrecto deben ser olvidadas)	contaminación con productos de amplificación	Repetir tipaje, asegurar funcionamiento exacto
	ADN contaminado con sales	Repetir extracción de ADN, probar diferentes métodos
	Concentración de ADN demasiado alta	usar menos ADN
	Concentración de enzima demasiado alta	usar menos enzima
La evaluación muestra más de 2 especificidades	Parámetros de amplificación incorrectos	optimizar los parámetros de amplificación (ver 4.3) ☆
	Contaminación por arrastre (productos de amplificación!) Nuevo alelo	comprobar mezclas de tipado (ADN no añadido) asegurar funcionamiento exacto
Ninguna o sólo bandas débiles visibles, estándar de longitud invisible	tinción con EtBr demasiado débil	repetir teñido
el fondo del gel tiene demasiado brillo	la tinción fue duró demasiado, concentración de EtBr demasiado alta	sumergir el gel en H ₂ O o TBE disminuir la concentración de EtBr
bandas borrosas	tampón de electroforesis demasiado caliente o agotado, tampón de electroforesis incorrecto, mala polimerización del gel	disminuir el voltaje usar tampón TBE 0,5x

☆ Cuando se usan equipamientos y materiales listados, la optimización de los parámetros de amplificación se debería buscar sólo como un último recurso. En la mayoría de los casos, es posible evaluar la prueba eliminando las bandas adicionales causadas por discrepancia en el tamaño.

7. Referencias

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









Additional references see www.bag-healthcare.com.


ROQUE L. ESPINOSA
 Bioquímico
 M.N. 9315


FELSAN S.R.L.
 Lic. ANDRÉS SANTINI
 DNI 26.644.967
 SOCIO GERENTE



8 SIMBOLOS UTILIZADOS EN EL RÓTULO

	Condiciones de conservación. Rango de Temperatura
	Temperatura de almacenamiento / Límite inferior de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Consulte las instrucciones de uso/Manual de instrucciones
	Contiene suficiente para n unidades de análisis
	Establecimiento elaborador
	Para uso diagnóstico in vitro
	Número de catálogo

Fabricante
BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich / Alemania

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 – C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Luis Espinosa
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro Nro PM-1544-7

Manual de instrucciones en otros idiomas:

<http://www.bag-healthcare.com>
<http://service.bag-healthcare.com>
or phone: +49 (0)6404-925-125

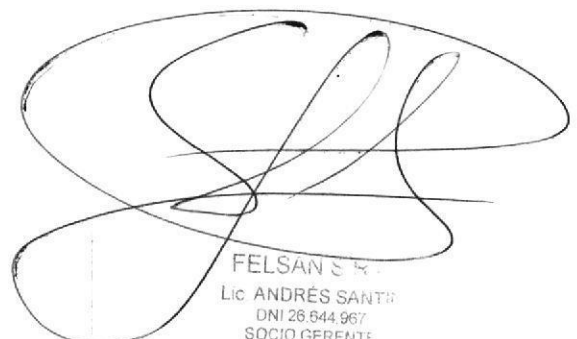


BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany
Tel.: +49 (0) 6404/925-0
Fax: +49 (0) 6404/925-250
www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404/925-450
Fax: +49 (0) 6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404/925-125
Fax: +49 (0) 6404/925-421
service@bag-healthcare.com


ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315


FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTIB
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



Instrucciones de uso
Happy Taq

CE

IVD

REF 70976

Contenido: 50 µl Taq Polimerasa, lista para usar
250 unidades (5 unidades/µl)

Especificaciones: Enzima recombinante termoestable
5' → 3' ADN polimerasa 5' → 3' actividad exonucleasa
No posee actividad exonucleasa 3' → 5' La enzima agrega nucleóticos al extremo 3'-del ADN (exclusivamente adenosina)

Almacenamiento: ≤ -20°C

Aplicación: Para uso con Kit HISTO TYPE y kits BAGene de BAG Health Care GmbH.

Para el procedimiento de prueba e información adicional, ver información de uso de kits HISTO TYPE SSP y BAGene SSP.

Significado de los símbolos utilizados en el rótulo

	Fecha de vencimiento		Consulte las instrucciones de uso/Manual de instrucciones
	Temperatura mínima de conservación		Establecimiento elaborador
LOT	Nro de Lote		
IVD	Producto para diagnóstico de uso in vitro		

Version: 3/2017 / Issue: 2017-08

Fabricante:
BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich / Alemania

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 – C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Luis Espinosa
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro N°: PM-1544-7



BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404/925-0 www.bag-healthcare.com
Fax: +49 (0) 6404/925-250 info@bag-healthcare.com

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404/925-450
Fax: +49 (0) 6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404/925-125
Fax: +49 (0) 6404/925-421
service@bag-healthcare.com

FELSAN S.R.L.
Lic. ANDRÉS SANTINI
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



**Instrucciones de uso
Happy Taq**

CE

IVD

REF 70976

Contenido: 50 µl Taq Polimerasa, lista para usar
250 unidades (5 unidades/µl)

Especificaciones: Enzima recombinante termoestable
5' → 3' ADN polimerasa 5' → 3' actividad exonucleasa
No posee actividad exonucleasa 3' → 5' La enzima agrega nucleóticos al
extremo 3'-del ADN (exclusivamente adenosina)

Almacenamiento: ≤ -20°C

Aplicación: Para uso con Kit HISTO TYPE y kits BAGene de BAG Health
Care GmbH.

Para el procedimiento de prueba e información adicional, ver
información de uso de kits HISTO TYPE SSP y BAGene SSP.

Significado de los símbolos utilizados en el rótulo

	Fecha de vencimiento		Consulte las instrucciones de uso/Manual de instrucciones
	Temperatura mínima de conservación		Establecimiento elaborador
LOT	Nro de Lote		
IVD	Producto para diagnóstico de uso in vitro		

Version: 3/2017 / Issue: 2017-08

Fabricante:
BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich / Alemania

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 – C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Luis Espinosa
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN
NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro N°: PM-1544-7



BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404/925-0
Fax: +49 (0) 6404/925-250

www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404/925-450
Fax: +49 (0) 6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404/925-125
Fax: +49 (0) 6404/925-421
service@bag-healthcare.com

Instrucciones de uso
Happy Taq

CE



IVD

REF 70976

Contenido: 50 µl Taq Polimerasa, lista para usar
250 unidades (5 unidades/µl)





Especificaciones: Enzima recombinante termoestable
5' → 3' ADN polimerasa 5' → 3' actividad exonucleasa
No posee actividad exonucleasa 3' → 5' La enzima agrega nucleóticos al
extremo 3'-del ADN (exclusivamente adenosina)

Almacenamiento: ≤ -20°C

Aplicación: Para uso con Kit HISTO TYPE y kits BAGene de BAG Health Care GmbH.

Para el procedimiento de prueba e información adicional, ver información de uso de kits HISTO TYPE SSP y BAGene SSP.

Significado de los símbolos utilizados en el rótulo

	Fecha de vencimiento		Consulte las instrucciones de uso/Manual de instrucciones
	Temperatura mínima de conservación		Establecimiento elaborador
LOT	Nro de Lote		
IVD	Producto para diagnóstico de uso in vitro		

Version: 3/2017 / Issue: 2017-08

Fabricante:
BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich / Alemania

Importador:
FELSAN S.R.L.
Estomba N° 288 – C.A.B.A.
Argentina

Director Técnico: Luis Espinosa
Consultas Técnicas: laboratorio@felsan.com.ar / TEL: 011 4554-7990

PRODUCTO DE DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Registro N°: PM-1544-7



BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404/925-0
Fax: +49 (0) 6404/925-250
www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404/925-450
Fax: +49 (0) 6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404/925-125
Fax: +49 (0) 6404/925-421
service@bag-healthcare.com

LUIS ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S.R.L.
LIC. ANDRÉS SANTI
DNI 26.644.967
SOCIO GERENTE



Modelo de hojas de trabajo

Rare-TYPE

BAGene product line

BAG HEALTH CARE



IVD

CE

LOT 605RA2

REF 6653

12/2018

2020-02

Worksheet

Reaktions-Nr. / Reaction no.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
PCR-Produkt (Größe in bp) PCR product (size in bp)		170	121	118	119	128	128	123	130	138	138	210	192	170	170	168	169
Rare-Merkmale Rare specificities		KEL*03	KEL*04	KEL*06	KEL*07	DI*01	DI*02	LU*01	LU*02	DO*01	DO*02	CO*01	CO*02	YT*01	YT*02	Vel-	Vel+
Keil	KEL*02.03	Kp(a+)	+														
	KEL*02.04	Kp(b+)		+													
	KEL*02.06	Js(a+)			+												
	KEL*02.07	Js(b+)				+											
Diego	DI*01	Di(a+)				+											
	DI*02	Di(b+)					+										
Lutheran	LU*01	Lu(a+)						+									
	LU*02	Lu(b+)							+								
Dombrock	DO*01	Do(a+)								+							
	DO*02	Do(b+)										+					
Colton	CO*01.01	Co(a+)												+			
	CO*02	Co(b+)												+			
Cartwright	YT*01	Yt(a+)														+	
	YT*02	Yt(b+)															+
Vel	Vel -	Vel -															+
	Vel +	Vel +															

Reaktionen / Reactions [+/-]																	
Ergebnis / Result																	

Mixe 4 und 6 konnten nur mit synthetischer DNA negativ getestet werden / Mixes 4 and 6 could be tested negative with synthetic DNA only
 Mixe 7, 8 und 9 reagieren manchmal schwach positiv / Mix 7, 8 and 9 react sometimes weak positive
 Beispiel siehe Kurzanleitung / Please see short instructions for examples

Proben-ID / Sample ID:

Name / Name:

Geb.-Datum / Date of birth:

Ergebnis / Result:

Datum / Date:

Unterschrift / Signature:

Gelbild / Gel picture:

HNA-TYPE

BAGene product line

BAG HEALTH CARE



IVD

CE

LOT 808HN1

REF 66701

12/2018

2020-02

WORKSHEET

Beispiel siehe Kurzanleitung / Please see short instructions for examples

Mix 1 zeigt manchmal eine schwache Reaktion / Mix 1 shows sometimes a weak reaction

Mix 7 zeigt manchmal eine schwache unspezifische Reaktion / Mix 7 shows sometimes a weak unspecific reaction

Reaktions-Nr. / Reaction no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PCR-Produkt (Größe in bp) PCR product (size in bp)	141	155	191	214	210	214	249	249	245	245
**HNA-Epitope **HNA epitopes	HNA-1a	HNA-1b HNA-1d	HNA-1c	HNA-3a var.	HNA-3a	HNA-3b	HNA-4a	HNA-4b	HNA-5a	HNA-5b
Primer-Position Allele / Alleles	*194A	*233C	*233A	*451T	*455G	*455A	*230G	*230A	*2372G	*2372C
FCGR3B*01	+									
FCGR3B*02		+								
FCGR3B*03			+							
SLC44A2*03 / SLC44A2*01				+	+					
SLC44A2*01					+					
SLC44A2*02						+				
ITGAM*01							+			
ITGAM*02								+		
ITGAL*01									+	
ITGAL*02										+
Reaktionen / Reactions [+/-]										
Ergebnis / Result										

Proben-ID / Sample ID:

Name / Name:

Geb.-Datum / Date of birth:

Ergebnis / Result:

Datum / Date:

Unterschrift / Signature:

Gelbild / Gel picture:

ROQUE L. ESPINOSA
Bioquímico
M.N. 9315

FELSAN S R L
L. ANDRES SANTILLANA
DNI 26 644 9315
SOCIO GERENTE
Version 8.0 - 07/2017

Achtung / Attention: Neue HNA Nomenklatur / New HNA nomenclature

(http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Granulocyte_Immunobiology/HNA_alleles_and_antigens.pdf)
Flesch et al. Update on the nomenclature of human neutrophil antigens and alleles. Transfusion Volume 00, March 2016.

** Achtung / Attention: Die SSP-Methode ermöglicht eine Typisierung der Allele, jedoch keine direkte Bestimmung der Epitope.
The SSP method enables the typing of the alleles, but not the direct determination of the epitopes.

BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 64 04 / 925 - 0
Fax: +49 (0) 64 04 / 925 - 250

www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:

Tel.: +49 (0) 64 04 / 925 - 450
Fax: +49 (0) 64 04 / 925 - 460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:

Tel.: +49 (0) 64 04 / 925 - 125
Fax: +49 (0) 64 04 / 925 - 421
service@bag-healthcare.com



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2021 - Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: ROT, E, INST, DE USO-FELSAN S.R.L

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 58 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2021.05.04 12:32:06 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2021.05.04 12:32:11 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2021 - Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: 1-47-3110-6607/18-2

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº 1-47-3110-6607/18-2

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por FELSAN S.R.L., se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de un nuevo producto para diagnóstico de uso in vitro con los siguientes datos característicos:

Nombre Comercial: **1) BAGene Rare – TYPE (ref. 6653); 2) BAGene HNA – TYPE (ref. 66701); 3) Happy Taq (ref. 70976).**

Indicación de uso: **1) KITS DE PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS RAROS, EL KIT DETERMINA LOS SIGUIENTES ALELOS: KEL *02.03, KEL *02.04, KEL *02.06, KEL *02.07, DI*01, DI*02, LU*01, LU*02, DO*01, DO*02, CO*01.01, CO*02, YT*01, YT*02, Vel- y Vel+; 2) KITS DE PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS SIGUIENTES ALELOS: HNA 1a/b/c, 3a/b, 4a/bw, 5a/bw; 3) ENZIMA RECOMBINANTE TERMOESTABLE.**

Forma de presentación: 1) y 2) Envases por 10 (diez) determinaciones, conteniendo: PCR PLATE (10 unidades), PCR Buffer 10x (1 vial x 1,1 ml),

PCR CAP (2 x 12 unidades); 3) 1 vial x 50 µl

Período de vida útil y condición de conservación: 1) y 2) 24 (VEINTICUATRO) meses, desde la fecha de elaboración conservado a $\leq -20^{\circ}\text{C}$; 3) 18 (DIECIOCHO) meses, desde la fecha de elaboración conservado a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

Nombre y dirección del fabricante: BAG Health Care GmbH. Amtsgerichtsstrasse 1-5. 35423 Lich. (ALEMANIA).

Condición de Venta/Categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO PM-1544-7.

Expediente N° 1-47-3110-6607/18-2

AM