

INSTRUÇÕES DE USO FAMÍLIA DOS KITS LABTYPE® SSO

1. USO PRETENDIDO

Tipagem de DNA para alelos HLA de Classe I e de Classe II.

PRODUTO PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO

2. INTRODUÇÃO

Os Antígenos leucocitários humanos (HLA) eram anteriormente determinados pelo teste de linfocitotoxicidade. Entretanto, com o advento das tecnologias da PCR, técnicas de tipagem baseadas em DNA tornaram-se rotina nos laboratórios. Para a grande maioria das metodologias baseadas em DNA, o processo da PCR é utilizado somente como um passo de amplificação para obter o DNA alvo necessário. Normalmente, o processo de tipagem HLA requer um passo pós-amplificação para discriminar entre os diferentes alelos (ex.: RFLP, SSOP, DOT BLOT reverso).

O kit LABType SSO utiliza sondas de oligonucleotídeos de sequência específica (SSO) ligados à beads codificadas por fluorescência para identificar alelos HLA na amostra de DNA. A introdução de uma etapa para amplificar o DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido por hibridação e detecção em um tubo único, torna esse método adequado tanto para os testes de pequena como para os de grande escala. Ao contrário da escala de reação de linfocitotoxicidade (1=negativo para 8=positivo), os resultados dos testes LABType® podem ser positivos ou negativos, facilitando a interpretação de resultados complexos. Diferenças em apenas um nucleotídeo podem ser diferenciadas na PCR-SSO, enquanto que grupos de reatividade cruzada (CREGs) tornam-se desafios na tipagem sorológica.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O kit LABType® utiliza a tecnologia Luminex ao método de tipagem de DNA por SSO reverso. Primeiro, o DNA alvo é amplificado por PCR usando um primer grupo-específico. O produto da PCR é biotilado (marcado com biotina), o qual permite ser detectado usando estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina (SAPE).

O produto PCR é desnaturado e depois hibridizado com sondas de DNA complementares aderidos à beads codificadas por fluorescência. Um analisador de fluxo, o Labscan™ 100 (Luminex 100/200) ou o Labscan 3D™ (Luminex FLEXMAP 3D®) identifica a intensidade de fluorescência da PE (ficoeritrina) em cada microesfera. O software de análise HLA Fusion™ auxilia na determinação da tipagem HLA que baseia-se no padrão de reação em comparação com os padrões das sequências dos genes HLA publicados.

4. COMPONENTES

O sistema de tipagem LABType® SSO fornece sondas de oligonucleotídeos de sequência específica, imobilizadas em beads para identificação de alelos HLA em amostras de DNA genômico, amplificadas através de PCR e com posterior hibridização. A análise é realizada utilizando um analisador de fluxo, o Labscan™ 100 (Luminex 100/200) ou Labscan 3D™ . Os componentes do sistema consistem em:

- Mistura de *beads* pré-otimizadas com sondas de oligonucleotídeos de sequência-específica para alelos HLA
- Tampão de hibridização para facilitar a ligação do DNA alvo a sonda específica
- Tampão de lavagem para eliminar resíduos da reação
- Tampão de SAPE para diluir a solução SAPE
- Reagentes para amplificação (mistura pré-otimizada de primers HLA Loco-específico): é essencial o uso do primer e bead kit-específico. Estes reagentes são extremamente específicos aos lotes e não são intercambiáveis entre os kits e lotes.
- D-mix (mistura de tampão de amplificação especialmente formulado).

A mistura de *beads* consiste de um conjunto de *beads* marcadas por fluorescência que possuem aderidas a sua superfície sondas únicas de oligonucleotídeos de sequência-específica para alelos HLA. Cada conjunto de *beads* inclui uma microesfera controle positivo e negativo para subtração de sinais não específicos (*background*) e normalização dos dados originais para ajustar as possíveis variações, em quantidade de amostra e eficiência de reação.

A mistura de *beads* é pré-otimizada para produtos de PCR específicos, obtidos pela amplificação de DNA usando mistura de primer HLA Loco-específico. Essas misturas de primer são otimizadas para amplificação de genes HLA específicos de 40 ng de DNA genômico purificado em um volume de 20 µL quando usado em conjunto com a D-mix, a quantidade de Taq polimerase recombinante e o programa da PCR detalhado abaixo.

Para cada lote, verifique a *worksheet* fornecido para os alelos HLA específicos, que podem ser identificados por cada sonda usando os procedimentos descritos abaixo. Para lotes específicos de sítios de sondas, consulte o documento Informações Sonda e Bead (*Bead Probe Information*).

Kit para 100 testes	
2,25 mL Tampão de Desnaturação - 1 frasco	4,95 mL Tampão de SAPE - 1 frasco
2,5 mL Tampão de Neutralização - 1 frasco	1,38 mL de Primer Set D-mix - 2 frascos de 690 µl cada
3,4 mL Tampão de Hibridização - 1 frasco	400 µl de Primer Loco-específico - 2 frascos de 690 µl cada
55 mL Tampão de Lavagem – 1 frasco	Bead - 400 µl LABType® SSO primário - 1 frasco/ * 20 µl Suplementar - 1 frasco

Kit para 20 testes	
50 µl Tampão de Desnaturação - 1 frasco	990 µl Tampão de SAPE - 1 frasco
100 µl Tampão de Neutralização - 1 frasco	276 µl de Primer Set D-mix - 1 frasco
680 µl Tampão de Hibridização - 1 frasco	80 µl de Primer Loco-específico – 1 frasco
10 mL Tampão de Lavagem - 1 frasco	Bead - 80 µl LABType® SSO - 1frasco

* **Nota:** Os kits LABType® (100 testes) podem conter dois frascos de Beads, conforme a necessidade, para melhorar a resolução: beads primárias e beads suplementares.

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Código	Informações sobre transporte	Temperatura de armazenamento
Toda a família	Os produtos devem ser transportados acondicionados com gelo reciclável	-80°C a -20°C na embalagem do produto

Não utilizar gelo seco para o transporte, pois, o CO₂ pode alterar as propriedades da DMIX.

Evite o manuseio desnecessário. Recomendamos que mantenha a caixa do kit intacto e congelado desde recebimento até à sua utilização. Segue um breve resumo das condições de armazenamento e manuseio necessários para assegurar a estabilidade dos reagentes LABType®.

5.1 Tampões LABType®

Todos os tampões LABType®, **com a exceção do tampão SAPE**, suportam uma faixa de armazenamento entre -80° a 25°C e podem ser recongelados. O Tampão SAPE não pode ser recongelado. O tampão SAPE deve ser mantido em uma faixa entre -80° a 8°C. Após o descongelamento, o Tampão SAPE deve ser armazenado sob refrigeração, entre 2° a 8°C.

5.2 Beads LABType® SSO

As beads LABType® são mais estáveis quando congeladas. Recomendamos o armazenamento inicial das beads a uma temperatura de -80° a -20°C até à utilização. Uma vez descongeladas, as beads não devem mais ser recongeladas, devendo ser conservadas entre 2 a 8°C por até 3 meses.

Importante: Para prolongar o prazo de validade das beads, não voltar a congelar e descongelar as mesmas.

5.3 Conjuntos de Primer e D-mix LABType®

Os Conjuntos de Primer e D-mix LABType® são mais estáveis quando congelados entre -80°C e -20°C. Ambos os reagentes podem ser submetidos a ciclos repetidos de congelamento-descongelamento. Portanto, recomendamos que sejam armazenados sempre a uma temperatura entre -80°C e -20°C.

5.4 Indicações de Instabilidade

Beads que exibem descoloração ou grumos, que não podem ser removidos por agitação em vortex, deverão ser desconsideradas para uso.

Se houve precipitação de sais na solução dos reagentes durante armazenamento ou transporte, redissolva por agitação prolongada em vortex em temperatura ambiente (20 a 25°C).

As alíquotas de D-mix, depois de serem descongeladas à temperatura ambiente (20 a 25°C), deverão apresentar coloração rosa a roxo claro. Qualquer alíquota de D-mix fora da coloração indicada deverá ser desconsiderada para uso.

6. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Etanol 70%
- Água deionizada
- Solução de hipoclorito a 0,5%
- Sheath Fluid (OLI Cat.#LXSF20 ou LSXF20X5)
- Taq polimerase recombinante
- Estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina (OLI Cat.# LT-SAPE)
- Tubos descartáveis de 15 a 50 mL
- Placa PCR de paredes finas com 96 poços, e suporte para placa PCR para uso em centrífuga que suporta de 1000 – 1300g
Obs.: A placa de PCR tem que estar em firme contato com o bloco.
- Selos para placa (OLI # SSPSEA300) ou tampas para tiras
Obs.: placas PCR (25) e selos para placas (180) suficientes para 2400 amostras podem ser solicitadas à One Lambda (OLI # PCRTRAC)
- Fonte de eletroforese – capacidade mínima de 150 V
- Sistema de gel da One Lambda (OLI # MGS-108)
- Transiluminador UV - capacidade mínima de 150 V
- Sistema de fotodocumentação
- Tampão TBE 1X (Tris-borato 89 mM; EDTA dissódico 2 mM, pH 8.0) com 0,5 µg/mL de brometo de etídio ou tampão TBE 5X com brometo de etídio (OLI # 5XTBE100)
- Agarose com grau para eletroforese
- Pressure Pad para PCR (OLI # SSPPAD)
- Banho de gelo ou equivalente
- Microtubos de 1,5mL
- Ponteiros descartáveis
- Microplaca capacidade 250 µL, formato de 96 poços, sem superfície tratada
- Papel alumínio
- Analisador de fluxo Labscan™ 100 (Luminex 100/200) ou Labscan 3D™ (Luminex® FLEXMAP 3D®)
- Plataforma Luminex® XY (acessório opcional para leitura automatizada de 96 amostras no analisador de fluxo Labscan™ 100 da empresa Luminex Corporation)
- Centrífuga
- Rotor para microtubos de 1,5 mL (14000 a 18000g)
- Rotor horizontal para microplaca de 96 poços (1000 a 1300 g)
- Agitador Vortex com velocidade ajustável

- Termociclador da Perkin-Elmer (Applied Biosystems) modelo 9700, equipado com tampa aquecida.
- Termociclador do sistema GeneAmp® 9600, 9700 ou termociclador Veriti™ de 96 poços (Applied Biosystems). Ajustar a velocidade de rampa para 9600, modo Emulation.

Obs: Outras especificações usadas devem ser validadas pelo laboratório

7. PRECAUÇÕES E AVISOS

Aviso: O brometo de etídio, usado para a coloração do gel (não incluso), é um produto carcinógeno conhecido. Manuseie com cuidados apropriados. Pode ser nocivo se absorvido pela pele. Evite que seja respingado nos olhos, na pele ou na roupa. Mantenha bem fechado. Lave bem as mãos após o manuseio. Lave a área contaminada com água em abundância.

Aviso: Os tampões de desnaturação e neutralização são corrosivos e podem causar queimaduras. No caso de contato, lave olhos ou pele imediatamente com bastante água por, pelo menos, 15 minutos enquanto, simultaneamente, remove roupas e sapatos contaminados.

Advertência de potencial risco biológico: A amostra deverá ser tratada como potencialmente infectante, uma vez que o DNA extraído é de origem humana, sem nenhum controle de infecção.

Cuidado: Cuidado especial deverá ser tomado no processo de alíquotagem. Falha no cumprimento das etapas descritas no item 8 deste documento, poderão resultar na perda de reagentes.

Cuidado: Mistura de beads LabType SSO são sensíveis à luz e precisam ser protegidas da luz.

Cuidado: use a mistura de beads LabType SSO dentro de três meses após terem sido descongeladas.

Para informações de segurança consultar a FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico) e/ou MSDS (Material Safety Data Sheet) para informações detalhadas.

8. AMOSTRAS

O DNA pode ser purificado a partir de leucócitos humanos por qualquer método de preferência.

A amostra de DNA a ser utilizada para análise por PCR-SSP deve ser suspensa em água estéril ou em Tris-HCl 10 mM, pH 8.0-9.0 a uma concentração de 20 ng/μL com uma pureza A260/280 de 1.65-1.80. Outras especificações usadas devem ser validadas pelo laboratório.

Amostras não devem conter inibidores de DNA polimerase e nem ser ressuspensas em soluções contendo agentes quelantes, tais como EDTA, acima de 0,5 mM de concentração.

As amostras de DNA devem ser utilizadas imediatamente após isolamento ou então devem ser armazenadas a -20°C ou abaixo durante longos períodos de tempo sem que ocorram efeitos adversos nos resultados.

As amostras de DNA devem ser enviadas a 4°C ou abaixo, a fim de preservar a integridade durante o transporte.

9. PREPARO DOS COMPONENTES

9.1 Amplificação (preparação na área de pré-PCR)

Aviso: Abra os pacotes contendo a mistura de amplificação de primer e D-mix somente na área de pré-PCR. Armazene esses itens em freezer entre -80°C e -20°C somente na área de pré-PCR.

- Configure o termociclador com a programação específico para o kit LABType® SSO, conforme descrito na Tabela 2. Confirme todos os parâmetros.
 - Ligue o termociclador para que seja iniciado o aquecimento da tampa.
 - Descongele o DNA, os primers e a D-mix. Mantenha em gelo até o uso.
 - Ajuste a concentração do DNA genômico para 20 ng/μL, utilize água estéril.
 - Agite em vortex a D-mix e o Primer de Amplificação, por 15 segundos. Dê um pulso em centrífuga ou aplique “flicagem” para que o que estiver na tampa desça.
 - Com base na Tabela 1, misture as quantidades indicadas de D-mix e Primers. Agite em vortex por 15 segundos, e coloque-os em gelo.
- Obs.: Para pipetagem precisa de Taq polimerase, é recomendado preparar a mix principal para pelo menos 10 reações.
- Adicione a Taq polimerase imediatamente antes do uso.

Tabela 1: Mistura de Amplificação

Nºde reações	D-Mix (μL)	Primer de Amplificação (μL)	Taq Polimerase (μL)
1	13,8	4	0,2
10	138,0	40	2,0
50	690,0	200	10,0
96	1491,0	432	21,6 (22)

- Pipete 2 μL de DNA (a 20 ng/μL) no fundo do poço (volume final de 20 μL por reação de PCR). Armazene os tubos ou placas parcialmente cobertos para prevenir evaporação e contaminação.
- Adicione a quantidade apropriada de Taq polimerase (ex. 0,2 μL [tipicamente a 5U/uL] por 20 μL de reação) a mistura de amplificação preparada na etapa 8.1.
- Agite em vortex por alguns segundos, e dê um pulso em centrífuga (3 a 5s).
- Adicione 18 μL de mistura de amplificação em cada poço contendo DNA.
Cuidado: para prevenir contaminação cruzada, não toque no DNA pré-aliquotado no fundo do poço.
- Feche com tampa ou selo. Se estiver usando um selo, certifique-se de que ficou bem vedado sobre cada borda de cada poço. Coloque a almofada emborrachada sobre a placa, antes de fechar a tampa do termociclador. Feche bem a tampa do termociclador.
- Corra a PCR conforme o programa descrito na tabela 2.
- Para o sistema GeneAmp® 9700, configure a velocidade da rampa para o programa do 9600. Para outros modelos, consulte o manual do fabricante para ajustar a velocidade da rampa a fim de simular o programa do GeneAmp® 9600. Diferenças significativas na velocidade da rampa pode afetar a eficiência da amplificação e dos resultados finais.

Tabela 2: Programa PCR para LABType® SSO

Etapa	Temperatura e Tempo de Incubação	Nº de Ciclos
Etapa 1	96°C 03:00	1
Etapa 2	96°C 00:20	5
	60°C 00:20	
	72°C 00:20	
Etapa 3	96°C 00:10	30
	60°C 00:15	
	72°C 00:20	
Etapa 4	72°C 10:00	1
Etapa 5	4°C infinito	1

- Após o termino da PCR, o DNA amplificado está pronto para seguir o procedimento de acordo com a etapa 10.2.

Recomenda-se o uso de 2-5 µL do DNA amplificado para análise em gel de eletroforese. A confirmação do produto amplificado (banda) garante ótima hibridização.

- Caso o produto amplificado não seja usado de imediato, armazene a placa a –20° a –80°C por até um mês.

9.2 Manuseio e Armazenamento das Beads

A utilização de material plástico recomendado (tubos, placas e ponteiros) para minimizar a beads LABType® SSO devido a adesão não específica, consultar materiais necessários mas não fornecidos. As beads podem se depositar ou se agregar se deixadas nos tubos, por isso devem ser eventualmente homogeneizadas antes de serem dispensadas. Agite bem o frasco por pipetagem repetitiva ou por vortex na posição horizontal por 10 a 30 segundos, ou tanto quanto necessário, para obter uma mistura totalmente homogênea.

O frasco de beads LABType® SSO é envolvido em papel de alumínio. Não remova o frasco dessa embalagem até o uso.

As beads LABType® SSO contêm corante fluorescente, bem como sondas HLA alelo específicas, ligadas à sua superfície. Para evitar a degradação das beads, proteja-as da luz durante o manuseio e armazenamento. Armazene-as a –20°C no tubo fornecido, bem fechado, até o momento do uso. Cubra os frascos das beads com papel alumínio durante o ensaio.

Uma vez que as beads foram descongeladas, armazene-as a 2-8°C e utilize no máximo, em até 3 meses. Não recongele as beads.

9.3 Preparação para o teste

Ligue o Analisador Luminex e a plataforma XY e siga o procedimento de inicialização conforme descrito nesse documento. O Analisador requer pelo menos 30 minutos para aquecimento.

Ligue o termociclador e execute um programa de 60°C HOLD (ou equivalente) por pelo menos 1 hora e 30 min (ou HOLD infinito). Deixe uma almofada emborrachada preparada para uso ao lado da máquina PCR (esta almofada auxilia a tampa da máquina a vedar melhor o selo que está sobre a placa PCR). Certifique-se de esperar até que a tampa do termociclador alcance a temperatura apropriada antes do uso. Use o suporte para placa 96 poços para assegurar a temperatura de incubação adequada.

Retire todos os reagentes de suas armazenagens e deixa atingir temperatura ambiente (exceto o frasco da solução SAPE 100X). Fracione volumes necessários de reagentes para frascos limpos. Utilize as Tabelas 3, 4 e 5 abaixo como referência. Preparar a solução SAPE 1X durante a terceira etapa de lavagem. Retire o frasco de Solução SAPE 100X do armazenamento somente quando necessário, e retorne imediatamente para armazenamento entre 2 a 8°C. Retorne qualquer alíquota que não esteja em uso de

Mistura de Beads e o tampão SAPE para armazenamento entre 2 a 8°C. (Não recongele a Mistura de Beads depois de ter sido descongelada).

9.4 Preparação de bead para kit LABType® de 100 testes contendo dois frascos

- Para kits LABType® contendo 2 frascos, dar um pulso em centrífuga por 10 a 15 segundos imediatamente após o descongelamento.
- Agitar os frascos em vortex durante 20 segundos em força média e, em seguida, dar um pulso em centrífuga como descrito acima.
- Faça homogeneização do frasco de bead primária, por pipetagem repetitiva utilizando Pipeta de 1000 µL ou equivalente para misturar a solução.
- Utilizando a mesma ponteira do passo acima, transferir cuidadosamente todo o volume de beads primárias para o frasco suplementar.
- Eliminar o frasco vazio de beads primárias. O frasco suplementar é rotulado com o identificador do novo lote referente a combinação de beads. O número deste lote é associado aos arquivos de análise e data sheet.
- Misturar o frasco com a combinação de beads vigorosamente, submetendo o tubo a agitação vortex 3 vezes, durante 10 segundos cada vez, a fim de obter ótima homogeneização. Utilizar imediatamente ou armazenar conforme descrito em Instruções de Armazenamento. Agite o frasco de beads durante pelo menos 20 segundos antes do uso.

Tabela 3: Preparo dos reagentes

Reagente	Volume por teste	Método de preparação e sugestões
Mistura de Beads	4 µL	Em temperatura ambiente, alíquotar o volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes dentro de um tubo limpo. Proteja da luz. Utilizar todo o conteúdo do tubo de mistura de beads para 96 amostras. Agite em Vortex imediatamente antes do uso
Tampão de hibridação	34 µL	Aliquotar exatamente para o mesmo número de testes conforme usado para a mistura de beads. Adicionar o tampão de hibridação a mistura pré-alíquotada de beads. Mantenha em temperatura ambiente (20 a 25°C) até o uso.
Tampão de lavagem	480 µL	Aliquotar o volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes requerido, e mantenha em temperatura ambiente (20-25°C). Utilize o volume completo suficiente para as 96 amostras.
Tampão de desnaturação	2,5 µL	Aliquotar o volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes, e mantenha em temperatura ambiente (20 a 25°C). Utilize o volume completo suficiente para as 96 amostras.
Tampão de neutralização	5 µL	Aliquotar o volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes, e mantenha em temperatura ambiente (20 a 25°C). Utilize completamente o volume de 2,5 mL para 96 amostras.
SAPE Estoque (100X)	0,5 µL	Durante a última etapa de centrifugação, prepare a solução SAPE 1X fazendo diluição 1:100 de SAPE Estoque com tampão SAPE para o número apropriado de reações, mais o volume extra*.
Tampão SAPE	49,5 µL	Proteja da luz. Preparar uma quantidade suficiente de solução SAPE 1X para 96 amostras (cerca de 110 amostras, dependendo do erro de pipetagem). Mantenha o frasco de SAPE Estoque a 2-8°C

*Obs.: O volume extra requerido depende da técnica de pipetagem e da calibração do equipamento.

Utilize o volume total de Mistura de Beads do tubo fornecido (suficiente para aproximadamente 110 testes) para 96 reações. Prepare SAPE 1X para 115 reações, e use o volume total dos outros reagentes para evitar que falte. Recomendamos a calibração de todos os aparelhos de pipetagem e testes com alíquotas de água para verificação. Para os reagentes fornecidos com volume em excesso, tal como Tampão de Desnaturação e Neutralização, poderá ser usado um recipiente para pipetagem com multicanal.

Tabela 4: Volume dos Reagentes

N° testes	Tampão de Desnaturação (µL)	Tampão de Neutralização (µL)	Tampão de Hibridação (µL)	Tampão de Lavagem (µL) para Placa	Mistura de Beads (µL)
1	2,5	5	34	480	4
10	25	50	340	4800	40
20	50	100	680	9600	80
50	125	250	1700	24000	200
96	240	480	3264	46080	384

Tabela 5: Volume de SAPE e Tampão SAPE

Número de Testes	Volume de SAPE Estoque 10X (µL)	Volume de Tampão SAPE (µL)
1	0,5	49,5
10	5,0	495,0
20	10,0	990,0
50	25,0	2475,0
96	48,0	4752,0

Obs.: o volume dos reagentes nas Tabelas 4 e 5 são para o número exato de testes. A quantidade real de alíquotas difere dependendo da precisão da pipetagem. Para um ensaio completo de 96 amostras, recomendamos que utilize toda a mistura de beads, todo o volume de tampão de hibridação, 57,5 µL de SAPE Estoque e 5693 µL de tampão SAPE, que é ligeiramente mais do que a quantidade exata necessária para o teste.

10. EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS UTILIZADAS EM CONJUNTO COM O PRODUTO

10.1 Operando o Sistema Luminex

Ligando o sistema

- Ligue a Bomba SD, depois o Analisador e, então, a Plataforma XY e finalmente o computador.

Inicialização

- Abra o programa Luminex
- No menu Startup, clique no comando WARMUP. Aguarde por 30 minutos até que o processo seja finalizado indicando STANDBY – na barra de ferramenta na parte abaixo da tela.
- Pressione o comando PRIME (executar 2 vezes sem reagente no reservatório).
- Pressione o comando ALCOHOL FLUSH (executar 1 vez com álcool 70% no reservatório).
- Pressione o comando WASH (execute 3 vezes com Sheath Fluid no reservatório).

Aquisição de dados: Em seguida descreve-se de um modo geral a aquisição de dados. Para maiores informações de como usar o Analisador Luminex consulte o Manual de Operação do equipamento.

Escolha o template de acordo o ID de catálogo e lote do produto.

- Esses arquivos estão disponíveis no website da One Lambda: download.onelambda.com
- Para criar o seu próprio template, siga as instruções no capítulo "Aquisição" do "Manual do Usuário do Luminex".
- Crie um nome para a bateria de testes que será analisada.
- Certifique-se de que o template escolhido esta correto.
- Na tela Luminex Batch Setup, insira a identificação das amostras.

Obs.: Se a mesma amostra for testada mais de uma vez, deverá ser atribuída identificação diferente.

- A placa está pronta para ser analisada.
- Coloque a placa na plataforma XY e certifique-se que o reservatório esta cheio com o reagente Sheath Fluid.
- Clique no botão START para iniciar a leitura. Após o termino da leitura, os dados obtidos serão salvos em arquivos do tipo CSV.

Análise LABType® HD:

- É necessário utilizar o software Luminex® versão IS 2.2/2.3 ou xPONENT 3.1 ou posterior.
- Certifique-se de nomear o lote novo (suplementar) e o batch ao ler e analisar os dados.
- Salvar a pasta completa com todos os arquivos de leitura para análise de dados no software HLA Fusion.

Desligando

- Ao final, clicar no comando WASH (executar 2 vezes com Sheath Fluid no reservatório).
- Em Seguida, clique no comando SANITIZE (execute 1 vez com hipoclorito de sódio 0,5% no reservatório).
- Clicar no comando WASH (executar 2 vezes com água destilada no reservatório).
- Clicar no comando SOAK (executar 2 vezes com água destilada no reservatório).

11. PROTOCOLO

11.1 Precauções Técnicas

Para analisar um pequeno número de amostras (48 ou menos) pode ser utilizada uma placa de 96 poços, uma placa que tenha sido cortada para o número apropriado de poços, ou tubos PCR em tira de parede fina com volume de 0,2 mL. Certifique-se de usar um suporte para tubos/placa PCR.

Agitar as amostras em uma placa de 96 poços devidamente selada e agitá-la em vortex em baixa velocidade por alguns segundos. Ajuste a velocidade do vortex de modo que o líquido dos tubos não espirre em demasia. Anote a velocidade ajustada e utilize-a para o método da placa de 96 poços.

O fechamento da placa de PCR deverá ser feita com cuidado para prevenir contaminação das amostras entre os poços. Sele a placa fechando o selador contra a borda de cada um dos 96 poços. Não reutilize os seladores. Utilize um selador novo em cada etapa que solicite o uso do selador. Uma pipeta automática poderá ser utilizada quando aplicável; entretanto, uma pipeta automática é menos precisa na dispensação do volume.

Recomendamos uma calibração regular e uma checagem de volume manual para cada volume a ser dispensado. Não utilize uma pipeta automática para dispensar a mistura de Hibridação.

11.2 Desnaturação/Neutralização

- Prepare um banho com gelo
- Coloque a placa de 96 poços ou as tiras de tubos em um suporte para placas
- Transfira 5 µL de cada amostra de DNA amplificado para outra placa limpa.
Obs.: Certifique-se de que a localização da amostra e sua identificação foram anotadas.
- Adicione 2,5 µL de Tampão de desnaturação. Misture bem por pipetagem, e incube em temperatura ambiente (20 a 25°C) por 10 minutos.
- Adicione 5µL de tampão de neutralização com uma pipeta e misture bem com a própria pipeta. Observar a mudança da cor de rosa para transparente ou amarelo claro.
- Coloque a placa PCR com o produto PCR neutralizado em banho de gelo.
- Cuidado: Evite a contaminação do produto amplificado com água.

11.3 Hibridização

Obs.: certifique-se que o termociclador foi ligado e o programa a 60°C esta em execução.

- Combine volumes apropriados de Mistura de Beads e Tampão de Hibridação para preparar a Mistura de Hibridização.
- Adicione 38 µL da Mistura de Hibridação a cada poço.
- Tampe a placa com selador e agite em vortex em baixa velocidade.
- Remova do suporte de placa e coloque a placa PCR no termociclador pré-aquecido a 60°C
- Coloque a almofada emborrachada sobre a placa (quando estiver usando selador ao invés de tampas). Feche bem o termociclador. Incube por 15 minutos.
- Coloque a placa em um suporte e remova o selador da placa. Rapidamente adicione 100 µL de Tampão de Lavagem em cada poço. Tampe a placa com o selador. Centrifugue a placa por 5 minutos a 900-1300 g. Coloque a placa no suporte de placas e remova o tampão de lavagem por “flicagem”.
- Repita a etapa acima mais duas vezes, perfazendo um total de 3 etapas de lavagens. Lembre-se de preparar a solução SAPE 1X durante a terceira centrifugação.

11.4 Marcação

- Coloque a placa no suporte de placas. Adicione 50µL de solução SAPE 1X em cada poço. Coloque o selador na placa e agite em vortex em baixa velocidade. Coloque a placa em termociclador pré-aquecido (60°C). Coloque a almofada emborrachada sobre a placa. Feche bem a termociclador. Incube por 5 minutos.
- Remova a placa. Coloque-a no suporte e remova o selador. Rapidamente adicione 100µL de Tampão de Lavagem em cada poço.
- Tampe a placa com o selador. Centrifugue a placa por 5 minutos a 1000-1300g. Coloque-a no suporte e remova o sobrenadante por “flicagem”.

- Adicione 70µL de tampão de lavagem em cada poço, e agite gentilmente por pipetagem. Transfira para a placa de leitura usando uma pipeta multicanal de 8 ou 12 poços. Evite contaminação entre amostras fazendo uso de ponteira nova em cada fileira.
Obs.: o volume final deverá ser de pelo menos 80µL
- Tampe a placa com selador e papel alumínio. Mantenha a placa no escuro e a 4°C até que seja colocada no Analisador Luminex® para a leitura.
- Para obter os melhores resultados, leia as amostras imediatamente. O armazenamento prolongado das amostras (superior a 4 horas) pode resultar em perda do sinal. Armazene as placas com selador a 4°C e no escuro se não for possível lê-las imediatamente. Certifique-se de agitar bem as amostras imediatamente antes da leitura.

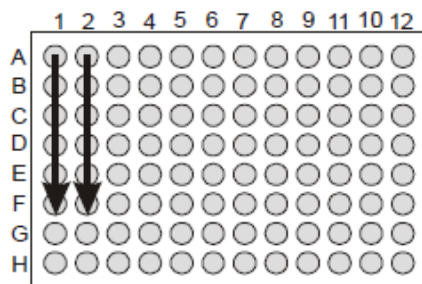


Figura: A plataforma XY lê a amostra conforme o seguinte padrão:
A1 para H1, A2 para H2,... A12 para H12.

11.5 Cálculos e obtenção dos resultados

Encontra-se abaixo a base de cálculo que o software HLA Fusion™ efetua em cima dos dados adquiridos no Luminex®. Não há necessidade de efetuar qualquer cálculo, uma vez que são feitos automaticamente pelo software de análise.

Base de Cálculo dos Dados

A intensidade média de fluorescência (MFI) gerado pelo Analisador Luminex®, ou equivalente, contém o MFI para cada bead (ou sonda ligada a bead) por amostra. A porcentagem do valor positivo é calculado da seguinte forma:

Cálculo de Positividade:

$$100 \times \left(\frac{\text{MFI (bead n)} - \text{MFI (bead CN)}}{\text{MFI (bead CP)} - \text{MFI (beadCN)}} \right)$$

A reação positiva é definida pelo percentual de valores positivos das sondas com valores acima do corte estabelecido pelo controle de qualidade da One Lambda. A reação negativa é definida como o percentual dos valores positivos inferior ao valor de corte.

Compare os percentuais de valores positivos calculados aos valores de corte pré-determinados para cada sonda testada. Designe um atributo positivo às sondas que tenham um percentual positivo acima do corte, e um atributo negativo àquelas que estiverem abaixo do corte. O MFI do controle positivo deverá estar entre 1200-7000 MFI (Caso o valor de MFI esteja fora desta faixa – ver Valores Esperados). O MFI de cada sonda é normalizado de acordo com o MFI controle positivo e é expresso como um percentual do MFI controle positivo. Os valores de corte de cada sonda foram estabelecidos com base em um painel de 100 a 200 amostras de DNA.

Determine o alelo HLA (ou grupo alélico) da amostra combinando o padrão de IDs das beads positivas e negativas com a informação na planilha LABType® SSO.

Para os ensaios de Alta Resolução e Kit Suplementar LABType™, é necessário utilizar o software HLA Fusion™ versão 2.0 ou a mais recente para a análise dos dados.

12. CONTROLE DE QUALIDADE

Uma corrida eletroforética deverá ser realizada antes de começar o processo de hibridação descrito na seção Instruções de Utilização, para que seja evidenciada amplificação de todas as amostras por reação em cadeia da polimerase (PCR).

No ambiente controlado de CQ do produto, a MFI referente ao controle negativo é tipicamente de 0a 100 e pode variar entre lotes e produtos específicos as locus. Os sinais fora da faixa podem representar controles ineficientes dos parâmetros do ensaio, tais como quantidade de amostra e/ou qualidade de amostra, técnica, calibração do instrumento e estado de todos os reagentes, inclusive DNA amplificado, tampões, SAPE, e a mistura de beads.

13. DESEMPENHO, INTERFERENTES E LIMITAÇÕES

13.1 Características específicas de desempenho

Em amostras normais e utilizando condições de ensaio e de aquisição de dados que estejam de acordo com as especificações descritas nesta instrução de uso (ex., concentração inicial do DNA genômico de 20 ng/μL e pureza DO260/280 entre 1.65 a 1.80, condições de temperatura de incubação da hibridização e de lavagem, e o estado do desempenho do LABScan™ 100 ou Labscan3D™), reações positivas e negativas são determinadas por comparação do MFI relativo da amostra ao seu valor de corte correspondente. O valor de corte foi experimentalmente determinado para cada lote de produto LABType® SSO e o corte é utilizado para distinguir entre os sinais positivos e negativos, baseados na genotipagem HLA da amostra. Espera-se que os resultados demonstrem a presença ou ausência de determinado(s) alelo(s) HLA, fornecendo uma indicação de tipagem regular.

13.2 Limitações do processo

O sistema LABType® SSO combina um processo de amplificação de DNA loco-específico e um processo de hibridização DNA-DNA. O procedimento, bem como a calibração do equipamento, deve ser seguido estritamente.

A amplificação de DNA é um processo dinâmico que requer condições estritamente controladas a fim de obter produtos PCR que são específicos ao gene alvo do HLA. O procedimento fornecido para a amplificação de DNA deve ser estritamente seguido. Especificamente, como a quantidade e a qualidade da amostra de DNA podem afetar significativamente a reação de amplificação, é de extrema importância que haja um procedimento extração de DNA padronizado e uma medição no espectrofotômetro a fim de avaliar a quantidade e qualidade do DNA, também recomendamos a análise eletroforética em gel. Além disso, para evitar a contaminação do material inicial com produtos da PCR, todos os materiais gerados após a amplificação do DNA (materiais pós-PCR, incluindo misturas de reagentes, todos os plásticos descartáveis, e equipamentos, tais como pipetas e materiais de eletroforese em gel) devem ser fisicamente separados dos materiais usados antes da amplificação de DNA (materiais de pré-PCR incluindo todos os plásticos descartáveis, pipetas, amostras de DNA, todos os outros reagentes usados para as reações de amplificação).

Recomenda-se a realização de testes de esfregaço na área de Pré-PCR com métodos de detecção validados e que estejam em conformidade com as diretrizes do órgão regulamentador competente.

O método de hibridização utilizado no LABType® SSO é um processo altamente sensível à variação de temperatura. A temperatura do bloco de aquecimento usado no ensaio precisa ser frequentemente calibrado. Os tempos de incubações e temperaturas devem ser seguidos rigorosamente para garantir a obtenção de resultados ótimos. As beads LABType® SSO são sensíveis à luz e precisam ser protegidos de sua incidência, tanto quanto for possível. Evite congelamento e descongelamento para assegurar um prazo de validade máximo.

Para minimizar a perda de beads durante o ensaio, siga o protocolo descrito aqui e use somente as ponteiros e tubos recomendados. A mistura de beads fornecida contém uma quantidade cuidadosamente otimizada de conjuntos de beads com sondas específicas para os alelos HLA. Qualquer alteração da mistura afetaria significativamente a precisão do ensaio e invalidaria o resultado.

Quando comparado ao SSP, o SSO apresenta mais ambiguidades porque as sondas utilizadas no SSO conseguem atingir apenas uma região do DNA por teste, enquanto que o SSP consegue atingir duas regiões por teste. Esta é uma limitação básica do método SSO, que é bem compreendida pelos profissionais da área. Conforme mencionado anteriormente, é fornecido uma lista Limitações de Resolução para cada lote dos kits LABType® SSO a fim de auxiliar na interpretação do padrão de reação e atribuição da tipagem HLA.

Todos os equipamentos (ex., termociclador, pipetas, analisador Luminex® e o bloco de aquecimento) devem ser calibrados de acordo com as recomendações de seus fabricantes.

Para obter informações lote-específico, consulte o documento Informações Sonda e Bead (Bead Probe Information).

Devido à complexidade das definições alélicas do sistema HLA, o especialista da área deve revisar e interpretar os dados e atribuir a tipagem HLA. Este teste não deve ser utilizado como a única fonte na tomada de decisão clínica.

13.3 Amplificação

Espera-se que a mistura de primer HLA Loco-específico fornecido produza quantidade adequada de produto amplificado. A falha na detecção do produto amplificado em gel de agarose corado com brometo de etídio invalida os resultados do teste.

Amplificação de DNA esta sujeita à contaminação por DNA anteriormente amplificado. A detecção de contaminação (fazendo uso do controle negativo na reação ou teste de esfregaço para detecção de contaminação de produto de amplificação) pode invalidar os resultados do teste.

13.4 Analisador Luminex

O Labscan™ 100 ou Labscan 3D são citômetros de fluxo avançados que requerem manutenção e calibração diária. Consulte o Manual do Usuário do Luminex® 100/200 ou Luminex FLEXMAP 3D® para conhecer todas as operações de manutenções necessárias. A manutenção diária inclui procedimentos de inicialização e desligamento. Para melhor desempenho, calibre o equipamento sempre que o valor de d Cal Temp apresentada na tela do software for superior a $\pm 3^{\circ}\text{C}$ no Labscan 100 ou a $\pm 5^{\circ}\text{C}$ no Labscan 3D . O equipamento deverá ser calibrado antes da leitura das amostras LabType® SSO.

13.5 Aquisição de Dados e Análise

Para obter dados válidos, dois parâmetros – Intensidade Média de Fluorescência (MFI) e a contagem – deverão ser monitorados para cada aquisição de dados. A contagem representa o número total de beads que foram analisadas, e a contagem deverá ser superior a $100 \pm 25\%$. Uma redução significativa na contagem sugere perda de beads durante a aquisição e ensaio da amostra e pode invalidar o teste. O MFI representa o sinal PE detectado dentro das beads contadas. MFI varia de acordo com o resultado da reação. O valor de MFI esperado da sonda controle positivo pode variar de lote a lote, e também devido a quantidade e/ou qualidade da amostra, técnica, calibração e condição de todos os reagentes, incluindo o DNA amplificado, tampões, SAPE e a mistura de beads.

A informação do CQ fornecido no software de análise apresentam valores específicos ao lote, obtidos utilizando-se DNA que atendem ao requisito da amostra (conforme descrito em Coleta e Preparo da Amostra). Recomenda-se aos usuários que calculem sua própria faixa para o valor de controle utilizando amostras de referência na validação de cada lote. A redução ou elevação significativa no MFI da sonda de controle positivo sugere quantidade e/ou qualidade inadequadas da amostra, eficácia reduzida do ensaio ou falha do equipamento e pode invalidar os resultados do teste.

14. GARANTIA

A **Biometrix Diagnóstica LTDA** situada na Rua Estrada da Graciosa, 1.081 CEP: 82840-360, Curitiba, Paraná, fornece garantia de todos os produtos por ela revendidos dentro dos seguintes termos:

Garantia

O produto **LABType SSO** é garantido pela Biometrix contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.

Exceções na garantia:

- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.

Extinção da garantia:

Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

BIOMETRIX DIAGNÓSTICA LTDA.

Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360

Tel.: (41) 2108-5250 Fax: (41) 2108-5252 DDG: 0800-7260504

E-mail: biometrix@biometrix.com.br Website: www.biometrix.com.br

CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

One Lambda, Inc.

21001 Kittridge Street

Canoga Park – CA – EUA

REGISTRO ANVISA

80298490005

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Flavia Stival

CRF/PR: 26565

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

REVISÃO	DATA	DESCRIÇÃO
00	12/2006	Elaboração
01	01/2011	Formatação, layout, produtos descontinuados, alteração nas condições de armazenamento e transporte, inclusão das denominações comerciais de cada item da família, Inclusão de número de registro em alteração de Responsável técnica
02	09/2011	Produtos descontinuados pelo fabricante: Rso2pb1 e rso2pb1t
03	01/2012	Produto incluso na família: rso2p
04	09/2012	Alteração do DDG
05	12/2012	Inclusão do produto: rso2pt, layout, revisão Ortográfica e gramatical, alteração de responsável Técnica
06	11/2015	Revisão ortográfica. Alteração de responsável técnica. Revisão conforme a ultima versão do fabricante.