

INSTRUÇÕES DE USO

MICRO SSP DNA

NOME DO PRODUTO

1. USO PRETENDIDO

Tipagem dos alelos HLA de Classe I e de Classe II.

PRODUTO PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO

2. INTRODUÇÃO

Historicamente, o método estabelecido para a determinação dos antígenos HLA foi o 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. O processo de tipagem HLA então requer um passo pós-amplificação para discriminar entre os diferentes alelos (ex.: RFLP, SSOP, DOT BLOT reverso).

Não semelhante a outros métodos baseados na PCR, a metodologia SSP empregada pela One Lambda, Inc., discrimina os diferentes alelos durante o próprio passo da PCR. Isso diminui o tempo de processo pós-amplificação para um simples passo de detecção em gel de eletroforese. Em contraste a escala de reação de linfocitotoxicidade (1=negativo para 8=positivo), os testes Micro SSP resultam em apenas positivo ou negativo facilitando a interpretação complexa de resultados. Diferenças em apenas um nucleotídeo podem ser discriminadas na PCR-SSP, enquanto que grupos de reatividade cruzada (CREGs) tornam-se desafios na tipagem sorológica. Finalmente, devido à natureza sintética dos reagentes utilizados na tipagem por DNA (ex. *primers*), estabilidade e variação lote a lote tem sido aperfeiçoada.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

A metodologia PCR-SSP baseia-se no princípio em que oligonucleotídeos completamente pareados, são eficientemente utilizados na amplificação da sequência alvo com auxílio da Taq polimerase, do que oligonucleotídeos não pareados totalmente. Pares de *primers* são desenhados para apresentar perfeito pareamento somente com a sequência de um alelo ou de um grupo de alelos.

Uma vez a PCR em condições controladas, pares de *primers* perfeitamente pareados amplificam a sequência alvo (isto é, resultado positivo) enquanto que pares de *primers* que não apresentam perfeito pareamento, não amplificam a sequência alvo (isto é, resultado negativo). Após o processo da PCR, os fragmentos de DNA amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados pela coloração com brometo de etídeo quando expostos a luz ultravioleta.

A interpretação dos resultados da PCR-SSP está baseada na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado específico. Uma vez que durante a PCR, o passo de amplificação pode ser afetado por vários fatores (erros de pipetagem, qualidade do DNA, presença de inibidores, etc.), um par de *primer* para controle interno está incluído em cada reação PCR. O par de *primer* de controle interno amplifica uma região conservada do gene da beta globina humana, o qual está presente em todas as amostras de DNA e é utilizado para verificar a integridade da reação PCR.

Na presença de uma banda positiva (amplificação específica do alelo HLA), o produto do par de *primer* do controle interno pode estar fraco ou ausente devido às diferenças na concentração e temperatura de ligação entre o par de *primer* específico e o par de *primer* do controle interno. Os fragmentos de DNA amplificados por um par de *primer* HLA específicos são menores do que o produto amplificado pelo par de *primers* do controle interno, mas maiores do que a banda de *primer* não incorporado e difuso. Deste modo, a reação positiva para o alelo ou grupo alelo-específico é visualizada no gel como um fragmento amplificado de DNA entre a banda do controle interno e a banda do *primer* não incorporado. (veja em Valores Esperados/Interpretação do Gel).

4. COMPONENTES

Os componentes do kit consistem de:

- Placa PCR de 96 poços;
- Selos adesivos para o fechamento da placa;
- Tubo contendo mistura de dNTPs (D-Mix);
- Planilhas de leitura;
- Instruções de Uso;
- Software para auxílio na interpretação.

As placas para tipagem por DNA Micro SSP™ apresentam *primers* sequência específicos para amplificação dos alelos HLA e do gene da beta globina humana através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). *Primers* pré-otimizados estão presentes (secos) em diferentes poços de uma placa de PCR. As placas podem ser de 96 poços de 0,2 mL ou de 384 poços de 0,1 mL (paredes finas) e estão prontos para a adição da amostra de DNA, Taq polimerase e D-Mix.

Cada placa contém um poço controle negativo que detecta o controle interno e valida a reação.

O controle interno utilizado é a beta globina humana que também esta presente em todos os poços da placa.

A quantidade de cada *primer* é ajustada para uma ótima amplificação de 100 ng de amostra de DNA quando utilizada em conjunto com a D-Mix Micro SSP™, a quantidade exigida de Taq polimerase e a reação PCR detalhada está descrita no Protocolo.

Código	Descrição	Composição
HNAGEN	Teste de Tipagem HNA MICRO SSP POR DNA – HNAGEN	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-Mix 180uL/tubo; selos adesivos
SSP1-NL	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Nulo - SSP1-NL - Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (4 testes/placa); 16 tubos de D-Mix 270uL/tubo; selos adesivos
SSP2H	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alta Resolução - SSP-2H - Classe II	10 placas PCR de 96 poços com primers (1 teste/placa); 10 tubos de D-mix 1000uL/tubo; selos adesivos
SSP2HQA1	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSP2HQA1 - Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 360uL/tubo; selos adesivos
SSP2-NL	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Nulo - SSP2-NL - Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (6 testes/placa); 24 tubos de D-Mix 180uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-01	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-01 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-03	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-03 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-05	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-05 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (1 teste/placa); 4 tubos de D-mix 1000uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-07	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-07 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (1 teste/placa); 4 tubos de D-mix 1000uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-08	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-08 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-11	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-11 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-13	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-13 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 450uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-14	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-14 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 360uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-15	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-15 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (1 teste/placa); 4 tubos de D-mix 1000uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-16	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-16 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-18	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-18 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540uL/tubo; selos adesivos
SSPR1-21	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8

SSPR1-C03	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-C03 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 450ul/tubo; selos adesivos
SSPR1-C04	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-C04 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540ul/tubo; selos adesivos
SSPR1-C05	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-C05 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 360ul/tubo; selos adesivos
SSPR1-C06	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-C06 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 270ul/tubo; selos adesivos
SSPR1-C07	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-C07 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540ul/tubo; selos adesivos
SSPR1-C08	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-C08 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 360ul/tubo; selos adesivos
SSPR1-C12	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-C12 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 360ul/tubo; selos adesivos
SSPR1-C14	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-C14 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/plac); 8 tubos de D-mix 180ul/tubo; selos adesivos
SSPR1-C15	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-C15 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 450ul/tubo; selos adesivos
SSPR1-C16	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR1-C16 Classe I	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 180ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-101	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-101 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-103	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-103 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 450ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-104	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-104 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-107	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-107 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 360ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-108	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-108 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 360ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-111	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-111 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-112	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – Alelo Específico - SSPR2-112 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primer (2 testes/placa); 8 tubos de D-Mix 360ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-113	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-113 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-114	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-114 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-115	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-115 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 540ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-116	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-116 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-Mix 270ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-3	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-3 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 450ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-4	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-4 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-Mix 180ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-5	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-5 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-mix 270ul/tubo; selos adesivos
SSPR2-Q1	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA - Alelo Específico - SSPR2-Q1 Classe II	4 placas PCR de 96 poços com primers (2 testes/placa); 8 tubos de D-Mix 450ul/tubo; selos adesivos
SSPT1-A1	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS C0320N - SSPT1-A1 - Classe I	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-A2	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB5623 - SSPT1-A2 - Classe I	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-B1	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS B5111N - SSPT1-B1 - Classe I	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-B2	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB15– SSPT1-B2 - Classe I	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras

SSPT1-B3	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB1836– SSPT1-B3 - Classe I	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-C1	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS A2409N - SSPT1-C1 - Classe I	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-C2	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB4803 - SSPT1-C2 - Classe I	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-C3	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB5619N – Classe I - SSPT1-C3	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-D1	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS A0301N – Classe I - SSPT1-D1	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-D2	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB4080 – Classe I - SSPT1-D2	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-D3	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB55 – Classe I – SSPT1-D3	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-E1	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS A0101N – Classe I - SSPT1-E1	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-E2	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS DRB50110N – Classe II – SSPT1-E2	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-E3	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB5201 – Classe I - SSPT1-E3	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-F1	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS B27+B81 – Classe I – SSPT1-F1	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-F2	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS DRB50108N – CLASSE II – SSPT1-F2	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-F3	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB5001 – CLASSE I – SSPT1-F3	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-G1	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS B27+B73 – CLASSE I – SSPT1-G1	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-G2	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS DRB40103N – CLASSE II – SSPT1-G2	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-G3	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB46 -CLASSE I – SSPT1-G3	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-H1	HLA Micro SSP AMBISTRIPS - CONTROLE NEGATIVO – SSPT1-H1	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-H2	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS C0409N – CLASSE I – SSPT1-H2	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras
SSPT1-H3	Teste de Tipagem HLA Micro SSP por DNA – AMBISTRIPS AmB3587 – CLASSE I- SSPT1-H3	1 tira de testes com primer (8 testes/fileira); 1 tubo de D-mix 1000 uL; tampas em tiras

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

- **Condições a evitar:** Calor e umidade;
- **Materiais a evitar:** A maioria dos metais comuns, amins, óxidos metálicos, anidrido acético, propiolactona, acetato de vinil, sulfato de mercúrio, fosfato de cálcio, formaldeído, álcalis, carbonatos, bases fortes, ácido sulfúrico, ácido clorossulfônico, agentes oxidantes fortes.

O material deverá ser transportado com gelo reciclável, onde suas temperaturas deverão ser mantidas a 4°C, uma vez que o gelo seco é considerado tóxico para alguns componentes do kit.

Na chegada ao laboratório, os reagentes deverão ser armazenados conforme temperatura indicada no pacote.

6. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Pipetas;
- Ponteiras descartáveis;
- Agitador de tubos do tipo *vortex*;
- Microcentrífuga;
- Rack e tampas para armazenamento de placas PCR de 96 poços;

- Borracha de pressão OLI Cat.#SSPPAD.

Nota: A borracha de pressão é adequada para um máximo de 300 PCR. Por favor, adquira uma nova borracha após este período.

- Termociclador PCR com formato para 96 poços e placa/retenção para tubos de paredes finas de 0,2 mL;
- Placa aquecida ou forno de micro-ondas para aquecer solução de agarose;
- Fonte para eletroforese (capacidade mínima de 150 V);
- Transiluminador UV;
- Sistema fotográfico ou de documentação de imagem;
- Taq polimerase (5 unidades/ μ L);
- Tampão TBE 1X (Tris-borato 89 mM, EDTA dissódico 2 mM com brometo de etídeo 0,5 μ g/ml);
- Agarose grau de eletroforese.

7. PRECAUÇÕES E AVISOS

D-mix: Pode ser prejudicial por inalação, ingestão ou absorção pela pele. Pode provocar irritação ocular e cutânea. O material é irritante para as membranas mucosas e vias aéreas superiores. A ingestão de grandes quantidades pode provocar dores de estômago, vômitos ou diarreia.

Glicerina: A exposição aguda pode provocar irritação e inflamação cutâneas, bem como irritação ocular. Pode provocar cefaleias, náuseas, diarreia e/ou vômitos. Entre os outros efeitos sistêmicos provocados pela exposição prolongada incluem-se desidratação, tonturas, hiperglicemia e sangue na urina (hemoglobinúria). (OSHA PEL= 10 PPM; ACGIH TLV= 10 PPM; NFPA= 1(Incêndio), 1 (Saúde), 0 (Reativo), 0 (Especial)).

Medidas de Primeiros Socorros

Em caso de contacto com os olhos: Lave imediatamente os olhos com água abundante durante um período mínimo de 15 minutos. Procure um médico.

Em caso de contacto com a pele: Lave imediatamente a pele com sabão e água abundante. Lave a roupa contaminada antes de voltar a usá-la.

Em caso de ingestão: Procure um médico. Se o doente estiver consciente, dê água, leite ou leite de magnésio.

Em caso de inalação: Retire para o ar fresco. Se não respirar, faculte respiração artificial. Se houver dificuldade respiratória, aplique oxigênio. Procure um médico.

Os resíduos gerados durante a utilização do produto devem ser descartados, de acordo com as diretrizes e regras de descarte de resíduos químicos e substâncias biológicas do laboratório, conforme legislação em vigor.

8. AMOSTRAS

1. O DNA pode ser extraído de leucócitos humano por qualquer método de preferência.
2. A amostra de DNA a ser utilizada para análise por PCR-SSP deve ser ressuspensa em água estéril ou em Tris-HCl 10 mM, pH 8.0-9.0 a uma concentração de 25-200 ng/ μ l com uma pureza A260/280 de 1.65-1.80.
3. **Amostras não devem ser ressuspensas em soluções contendo agentes quelantes tais como EDTA acima de 0,5mM de concentração.**
4. As amostras de DNA devem ser utilizadas imediatamente após isolamento ou então devem ser armazenadas a -20°C ou abaixo para longos períodos de tempo (acima de um ano) isto evita efeitos adversos nos resultados.
5. Para preservar sua integridade, as amostras de DNA devem ser transportadas enviadas a 4°C (ou abaixo).

9. PREPARO DOS COMPONENTES

Consultar Protocolo.

10. EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS UTILIZADAS EM CONJUNTO COM O PRODUTO

- Pipetas;
- Ponteiras descartáveis;
- Agitador de tubos do tipo *vortex*;
- Microcentrífuga;
- Rack e tampas para armazenamento de placas PCR de 96 poços;
- Borracha de pressão OLI Cat.#SSPPAD.

Nota: A borracha de pressão é adequada para um máximo de 300 PCR. Por favor, adquira uma nova borracha após este período.

- Termociclador PCR com formato para 96 poços e placa/retenção para tubos de paredes finas de 0,2 mL;
- Placa aquecida ou forno de micro-ondas para aquecer solução de agarose;
- Fonte para eletroforese (capacidade mínima de 150 V);
- Transiluminador UV;
- Sistema fotográfico ou de documentação de imagem;
- Taq polimerase (5 unidades/ μ L);
- Tampão TBE 1X (Tris-borato 89 mM, EDTA dissódico 2 mM com brometo de etídeo 0,5 μ g/ml);
- Agarose grau de eletroforese.

11. PROTOCOLO

Programando o Termociclador

O programa seguinte é designado somente para Perkin Elmer 9600 ou 9700. Se você possui um termociclador de marca ou modelo diferentes, deverão se realizadas adaptações em sua máquina. Programe o seu termociclador conforme a seguir.

Programa PCR – One Lambda (OLI-1)

# de ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (seg.)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Final	1	4	--

Para informações sobre o termociclador, veja o manual do usuário.

Preparo do Gel de agarose 2,5%

(Para o Sistema de Gel Micro SSP™, OLI Cat.# MGS108)

- i. Montagem:
 - Deslizar o pino de travamento da base para abrir a posição da caixa.
 - Inserir a caixa de gel na base de acordo com o código de cores para garantir apropriada orientação.

- Travar a caixa de gel na base através do deslizamento do pino para a posição travada.
- Utilize a bolha niveladora e os três pés ajustáveis para nivelar a base.
- ii. Orientar e inserir os 14 pentes no suporte de pentes.
- iii. Para 100 mL de TBE 1X com 0,5 µl/mL de brometo de etídeo (em uma garrafa de vidro de 500 mL), adicionar 2,5 g de agarose grau de eletroforese. Aquecer até que uma solução homogênea esteja formada.
- iv. Adicionar 30 mL da solução de gel na caixa de gel. Tenha certeza de que a agarose tenha coberto totalmente a superfície inclinando a caixa de gel para trás e para frente imediatamente após a adição da solução de gel. Rapidamente, encaixar o suporte de pentes na caixa de gel através do código de cores. Aguarde 15 minutos.
- v. Remover os pentes do gel levantando o suporte de pentes enquanto segura-se a base. Adicionar 10 mL de tampão TBE 1X contendo brometo de etídeo a 0,5 µg/mL de modo que o tampão cubra todos os poços.

Eletroforese em Gel

(Somente para o Sistema de Gel Micro SSP™, OLI Cat.#MGS108)

- i. Após o término da reação PCR:
 - Oriente a placa PCR e a caixa de gel com poço do controle negativo no canto superior esquerdo.
 - Gentilmente, remover o selador da placa evitando que a amostra espirre.
- ii. Transferir cada reação PCR (10 µl) na sequência para o gel de agarose 2,5%. Ter cuidado para transferir todas as amostras na sequência apropriada. (Não é necessário acrescentar corante de eletroforese). Utilizar uma pipeta multicanal de oito ou 12 canais ou o Sistema de Transferência da One Lambda.
Nota: A ordem das amostras (de acordo com a *worksheet*) é da esquerda para a direita, de cima para baixo.
- iii. Cobrir a caixa de gel com a tampa de acordo com o padrão de cores. Realizar a eletroforese a 140-150 volts até que a linha do corante vermelho tenha migrado aproximadamente 0,5 cm no gel (aproximadamente 3-5 minutos, dependendo da agarose utilizada). Remover a tampa.
- iv. Deslizar o pino de travamento da base para a posição aberta e remover a caixa de gel. Transferir a caixa do gel para o transiluminador UV. Fotografar o gel.
- v. Orientar a reação do controle negativo no canto superior esquerdo e marcar os grupos alélicos positivos correspondentes na *worksheet* fornecida com a placa.

PROCESSO DE MEDIÇÃO

Preparo da Amostra

1. DNA genômico extraído de leucócitos pelo método de escolha. A concentração final do DNA deve ser de 25-200 ng/µL (100 ng/µL é o valor ótimo) com a razão de A260/A280 entre 1.65-1.80.
2. Para informações específicas sobre o preparo da amostra e armazenamento, consultar Coleta e Preparo da Amostra conforme descrito acima.
3. Amplificar a amostra de DNA utilizando as placas Micro SSP™ ou armazenar a -20°C ou abaixo até a tipagem.

Preparo de Reagente/Equipamento

1. Programar o termociclador para corrida de acordo com programa One Lambda (consultar Requisitos do Equipamento conforme descrito acima)
2. Tenha disponível: Taq polimerase recombinante (5 un/ μ L). Armazenar a -20°C .
3. Preparar o gel de eletroforese (2,5% de agarose) utilizando o Sistema de Gel Micro SSP™ (Cat.# MGS108) ou similar.

Instruções para Pipetar Taq polimerase

Os testes de controle de qualidade da One Lambda indicam que o volume de Taq polimerase é mais do que suficiente para o número de testes indicado no produto. Se for solicitado Taq polimerase adicional, isto deverá ser feito diretamente para F. Hoffmann-La Roche ou seus representantes.

Para evitar desperdício, por favor, siga as simples instruções listadas abaixo para pipetar a Taq polimerase.

Nota: A Taq polimerase é muito viscosa e cuidados especiais devem ser tomados no processo de alíquotagem. Quaisquer falhas nos passos descritos abaixo podem resultar na perda de reagentes.

1. Pipetar lentamente utilizando uma pipeta calibrada.
2. A ponteira somente deve ultrapassar a superfície da Taq.
Precaução: Não mergulhar a ponteira na Taq.
3. Cuidadosamente limpar o excesso de Taq polimerase na borda do frasco.

Procedimento Passo a Passo

1. Remover de suas temperaturas indicadas de armazenamento a amostra de DNA, o(s) tubo(s) contendo a *D-Mix* e a placa utilizada no teste e descongelar a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$). No caso de utilizar placas com mais de um teste, pode-se recortar apenas o número de testes a serem realizados e retornar rapidamente o restante para as apropriadas temperaturas de armazenamento.
 - Homogeneizar as amostras de DNA.
 - Colocar a placa PCR sobre um suporte e remover o adesivo.
2. Remover a Taq polimerase recombinante da temperatura de -20°C , e manter no gelo até o uso.
3. Pipetar 1 μL do diluente do DNA no controle negativo da placa.
4. Adicionar a Taq polimerase recombinante (5 un/ μL) no tubo da D-mix. Consulte a Tabela de Referência para verificar a quantidade.
5. Fechar o tubo e agitar por 5 segundos. Centrifugar em microcentrífuga para que todo o volume da D-mix das paredes do tubo vá para o fundo.
6. Pipetar 9 μL de D-mix no tubo de controle negativo de cada teste.
7. Adicionar o volume de DNA de acordo com a Tabela de Referência.
8. Fechar o tubo e agitar por 5 segundos. Centrifugar em microcentrífuga.
9. Dispensar 10 μL da mistura em cada tubo PCR da placa, exceto no controle negativo.

Importante: Esta mistura deve ser adicionada na parede de cada tubo para que não haja o contato da ponteira com os *primers* que estão alíquotados no fundo de cada tubo e evitando desta maneira, contaminação entre eles.

Observar para que todas as amostras deslizem pela parede até o fundo dos tubos. Caso contrário, bater levemente a placa sobre a bancada para que a amostra deslize para o fundo.

10. Vedar a placa com o adesivo selador. Verifique se todos os tubos estão completamente vedados para garantir perfeita vedação a fim de prevenir a evaporação durante a PCR.
11. Acoplar a placa teste no termociclador Perkin Elmer 9600 ou modelo similar com um adaptador de tubos.
12. Colocar a borracha de pressão sobre a placa com o lado da textura para cima antes de fechar a tampa do termociclador.
13. Colocar o número do programa apropriado. Se disponível, especificar o volume de reação de 10 µL.
14. Iniciar o programa que leva aproximadamente 1h16min. O último passo deve permanecer a 4°C até que a bateria tenha terminado.
15. Remover a placa do termociclador. Gentilmente remover o selador sem espirrar as amostras. Ou, armazenar as amostras a –20°C até a corrida eletroforética.
16. Transferir cada reação PCR (10 µL) na sequência para o gel de agarose 2,5% no sistema de Gel Micro SSP. Utilizar uma pipeta multicanal de 8 ou 12 poços ou o Sistema de Transferência da One Lambda.

Nota: Tenha certeza de transferir todas as amostras na sequência apropriada, orientando a placa com o poço correspondente ao controle negativo para o canto superior esquerdo. A ordem das amostras (para parear com a Worksheet) é da esquerda para a direita, de cima para baixo. Não é necessário acrescentar corante para a corrida eletroforética.

17. Realizar a eletroforese a 140-150 volts até que o corante vermelho tenha migrado aproximadamente 0,5 cm no gel (aproximadamente 3-5 minutos, dependendo da agarose utilizada)
18. Fotografar o gel no transiluminador UV.
19. Interpretar os resultados da tipagem utilizando a *worksheet* fornecida com as placas ou com auxílio do *software* HLA One Lambda, Inc.

Nota: Quando a placa completar somente algumas filas do gel, é possível colocar várias amostras em um gel. Tomar cuidado para registrar as posições das amostras no gel.

12. CONTROLE DE QUALIDADE

Todo laboratório deverá adotar a prática de controle de qualidade interna, conforme seus próprios padrões.

Recomenda-se que a cada novo lote de produto que chegue ao laboratório, um DNA conhecido seja colocado para amplificar juntamente com as amostras do dia para verificação de seu resultado, com o resultado anteriormente obtido.

Procedimentos adequados de trabalho com amostras biológicas e DNA devem ser estudados e adotados pelo laboratório.

13. DESEMPENHO, INTERFERENTES E LIMITAÇÕES

A PCR-SSP é um processo dinâmico que requer altas condições de controle para garantir amplificação discriminatória. O procedimento deve ser rigorosamente seguido.

A amostra de DNA extraída fornece um molde para um processo de amplificação específico e, desta forma, a concentração e a pureza devem estar dentro dos valores especificados no produto.

Todos os instrumentos (máquina PCR, pipetas) devem ser calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Para informação lote específico, veja no documento Limitações de Resolução.

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

Os produtos Micro SSP são garantidos 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

80298490006

RESPONSÁVEL TÉCNICA

FLAVIA STIVAL

CRF/PR: 26565

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

REVISÃO	DATA	DESCRIÇÃO
00	10/2016	Criação do documento
01	01/2010	Formatação, layout, produtos descontinuados, alteração nas condições de armazenagem e transporte, inclusão das denominações comerciais de cada item da família, inclusão de número de registro em alteração de Responsável Técnica
02	12/2011	Inclusão e exclusão de itens.
03	09/2012	Alteração do DDG
04	10/2012	Inclusão item 06 e revisão ortográfica
05	12/2012	Formatação, revisão gramatical e ortográfica e alteração de Responsável Técnica.
06	09/2012	Inclusão Ambistrips
07	09/2016	Padronização do documento conforme requisitos da RDC36/2015