



A Thermo Fisher Scientific Brand

FOLHETO INFORMATIVO DO
PRODUTO**Placas de Tipagem Micro SSP™ HLA DNA****REF**

N.º Catálogo Consultar o **Quadro de Referência de Produtos de Placa de Tipagem de DNA Micro SSP™ HLA** para obter os números de catálogo dos produtos da OLI, componentes específicos dos produtos e requisitos.

IVD

Para utilização em diagnósticos in vitro.

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Tipagem de DNA de alelos HLA de Classe I ou Classe II.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Historicamente, o método estabelecido para a identificação de antígenos HLA era o teste de linfocitotoxicidade.¹ Todavia, com o advento das tecnologias de PCR, as técnicas de tipagem tecidular baseadas em DNA tornaram-se uma rotina laboratorial. Para a maioria das metodologias baseadas em DNA, o processo de PCR é utilizado apenas como um passo de amplificação para obter o DNA alvo necessário. Decorrente disso, o processo de tipagem HLA requer um passo de pós-amplificação para discriminar entre os vários alelos (por exemplo, RFLP, SSOP, Dot Blot reverso). Ao contrário dos outros métodos baseados em PCR, a metodologia SSP utilizada na tipagem de DNA Micro SSP™ da One Lambda, Inc. discrimina entre os vários alelos durante o processo de PCR.² Isso incurta o tempo de processamento pós-amplificação para um passo simples de detecção em electroforese em gel. Ao contrário da escala de reação de linfocitotoxicidade (1 = negativo a 8 = positivo), os resultados do teste Micro SSP™ são positivos ou negativos. Isso elimina a necessidade de uma interpretação complexa dos resultados. Além disso, alterações únicas de nucleotídeos podem ser discriminatórias em PCR-SSP, enquanto que os grupos que estabelecem reações cruzadas (CREGs) proporcionam grandes desafios para a tipagem serológica.³ Finalmente, e graças à natureza sintética dos reagentes de tipagem de DNA (por exemplo, primers de oligonucleótidos), a estabilidade melhorou muito e a variância de lote a lote diminuiu.

PRINCÍPIO(S)

A metodologia de PCR-SSP baseia-se no princípio de que primers de oligonucleotídeos com correspondência completa são utilizados de forma mais eficaz para amplificar uma sequência alvo do que um primer de oligonucleotídeos sem correspondência por Taq polimerase recombinante. Os pares de primers são concebidos para apresentar apenas correspondências perfeitas com um único alelo ou grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares de primers com correspondência perfeita traduzem-se na amplificação de sequências alvo (ou seja, um resultado positivo), enquanto que pares de primers sem correspondência não se traduzem em amplificação (ou seja, um resultado negativo). Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição a luz ultravioleta. A interpretação dos resultados de PCR-SSP baseia-se na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado específico. Dado que a amplificação durante a reação de PCR pode ser influenciada adversamente por vários fatores (erros de pipetagem, DNA de qualidade deficiente, presença de inibidores, etc.), existe um par de primers de controle interno incluído em todas as reações de PCR. O par de primers de controle amplifica uma região conservada do gene da β -globina humana, que está presente em todas as amostras de DNA humano e é usada para confirmar a integridade da reação de PCR. Na presença de uma banda de tipagem positiva (amplificação específica de um alelo de HLA), o produto do par de primers de controle interno pode ser fraco ou estar ausente, dadas as diferenças de concentração e de temperaturas de fusão entre os pares de primers específicos e o par de primers de controle interno. Os fragmentos de DNA amplificados dos pares de primers de HLA específicos são menores do que o produto do par de primers de controle interno, mas,



maiores do que a difusa e não incorporada banda de primer. Portanto, uma reação positiva para um alelo ou grupo de alelos de HLA específico é visualizada no gel como um fragmento de DNA amplificado entre a banda do controle interno do produto e a banda do primer não incorporado (Consultar **Valores Esperados/Interpretação do Gel**).

REAGENTES

A. Identificação

As Placas de Tipagem de DNA Micro SSP™ fornecem primers de oligonucleótidos específicos de sequência para amplificação de alelos de HLA e do gene da β -globina humana por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os primers pré-otimizados (secos) estão presentes em diferentes poços de uma placa de tubos de parede fina de 0,2 ml com 96 poços para PCR e estão prontos para a adição de amostras de DNA, Taq polimerase recombinante e mistura de dNTP-tampão especialmente formulada (Micro SSP™ D-mix). Cada placa de tipagem inclui um tubo de reação de controle negativo que detecta a presença do controle interno produzido pela Placa de Tipagem de DNA Micro SSP™. O controle interno de PCR amplificado a partir do gene da β -globina humana é o produto de PCR com maior probabilidade contaminante, dada a sua amplificação em todos os poços. A quantidade de cada primer é ajustada para uma amplificação ideal de 100 ng de amostra de DNA quando usada em conjunto com o Micro SSP™ D-mix, a quantidade prescrita de Taq polimerase recombinante e o perfil da reação de PCR detalhado neste documento (página 2). Consultar a folha de trabalho fornecida para alelos específicos passíveis de amplificação por cada conjunto de primers sob as condições de PCR especificadas do ensaio.

Para localizações de primers específicos de lote, consultar o documento de Informações do Primer.

IVD

B. Atenção ou Aviso

1. Designação da FDA: IVD
2. **Atenção:** As pipetas usadas para manipulações **pós-PCR não** deverão ser usadas para manipulações **pré-PCR**.
3. **Atenção:** Advertência de Potencial Risco Biológico: O brometo de etídio usado para a coloração do DNA é potencialmente cancerígeno. Usar sempre luvas quando manipular géis com coloração.
4. **Atenção:** Advertência de Potencial Risco Biológico: Todos os produtos derivados do sangue devem ser tratados como potencialmente infecciosos. Constatou-se que o material de origem do qual deriva este produto é negativo quando testado em conformidade com os testes atualmente exigidos pela FDA. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer garantias de que os produtos derivados do sangue humano não transmitem agentes infecciosos.
5. **Aviso:** Utilizar proteção para os olhos com bloqueio de UV e não olhar diretamente para a fonte de luz UV quando observar ou fotografar os géis.
6. Consultar a ficha de dados de segurança dos materiais para obter informações detalhadas.

C. Preparação dos reagentes para utilização

1. Consultar **Instruções de Utilização**.

D. Instruções de armazenamento

Armazenar os reagentes à temperatura indicada na embalagem. Usar antes do final do prazo de validade impresso.

E. Purificação ou tratamento necessários para utilização

Consultar **Instruções de Utilização**.

F. Indicações de Instabilidade

1. Não usar placas de conjuntos de primers com fissuras nos tubos ou no rótulo adesivo, que poderão provocar perdas por evaporação.
2. Se os sais tiverem precipitado fora da solução nas alíquotas de D-mix durante o transporte ou armazenamento, voltar a dissolvê-los submetendo a agitação prolongada à temperatura ambiente (de 20 a 25° C).



3. As alíquotas de D-mix, após descongelar à temperatura ambiente (de 20° a 25°C), deverão apresentar uma cor rosa a roxo claro. Qualquer alíquota de D-mix sem a coloração especificada deverá ser considerada como inutilizada.

REQUISITOS DO INSTRUMENTO

A. Programação do termociclador

Sistema GeneAmp® PCR 9600, 9700, de 96 poços, ou Termociclador Veriti™ de 96 poços (Applied Biosystems) ou equivalente. Para o Sistema GeneAmp® PCR 9700 de 96 poços, configurar a velocidade de rampa para 9600. Para o Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, configurar a velocidade de rampa para o Modo de Emulação 9600. Programar o termociclador antes de iniciar o Procedimento “Passo-a-Passo” em baixo.

Programa de PCR One Lambda (OLI-1)

<u>Quant. de</u> <u>ciclos</u>	<u>Passo</u>	<u>Temp. (°C)</u>	<u>Tempo</u> <u>(seg.)</u>
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Fim	1	4	---

Para informações específicas do termociclador, consultar o manual do usuário do fabricante.

B. Preparação do Gel de Agarose a 2,5%

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

1. Para montar:
 - a. Deslizar o pino para trancar (localizado na base) para a posição de aberto.
 - b. Introduzir a caixa de gel na base, fazendo corresponder os lados codificados com cores para garantir uma orientação adequada.
 - c. Trancar a caixa de gel na base deslizando o pino para a posição de fechado.
 - d. Utilizar a bolha niveladora e as três pernas ajustáveis em altura para nivelar a base.
2. Orientar e introduzir completamente os 14 pentes de gel no suporte de pentes de gel.
3. Acrescentar 2,5 g de agarose de grau de eletroforese a 100 ml de 1x tampão de EDTA Borato Tris (1x TBE) com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (num frasco de vidro de 500 ml). Aquecer até que se forme uma solução homogênea.
4. Acrescentar 30 ml da solução de gel à caixa do gel. Certificar-se de que a agarose cobre uniformemente toda a superfície inclinando a caixa do gel de um lado para o outro imediatamente após a adição da solução de gel. Colocar rapidamente o suporte de pentes de gel na caixa de gel cheia, fazendo corresponder os códigos de cor. Deixar assentar durante 15 minutos.
5. Retirar os pentes de gel levantando o seu suporte enquanto segura na base. Acrescentar uniformemente 10 ml de TBE 1X contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio ao longo do gel para encher todos os poços.

C. Eletroforese em gel

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

1. Depois de concluir a reação de PCR:
 - Orientar a placa do conjunto de primers de DNA e a caixa de gel com o poço de controle negativo no canto superior esquerdo.
 - Retirar suavemente o selo da placa sem espirrar as amostras.

2. Transferir cada reação de PCR (10 µl) em sequência ao gel de agarose a 2,5%. Certificar-se de que transfere todas as amostras na sequência adequada. (Não é necessário acrescentar qualquer corante para eletroforese). Recomenda-se a utilização de uma pipeta de 8 ou 12 canais Pipetman® é recomendado.
NOTA: A ordem das amostras (para corresponder à folha de trabalho) é da esquerda para a direita, de cima para baixo.
3. Fechar a caixa de gel com a respectiva tampa fazendo corresponder os lados codificados com as cores. Submeter as amostras à eletroforese a 140-150 volts até que o corante de rastreo vermelho tenha migrado aproximadamente 0,5 cm no gel (cerca de 3 a 5 minutos, dependendo da agarose usada). Retirar a tampa.
4. Deslizar o pino para trancar (localizado na base) para a posição de aberto e retirar a caixa de gel. Transferir a caixa de gel para um transiluminador UV. Fotografar o gel concluído.
5. Orientar a fotografia com a reação do controle negativo no canto superior esquerdo e marcar os grupos de alelos positivos correspondentes na folha de trabalho fornecida com a placa.

COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- A. O DNA pode ser purificado a partir de leucócitos humanos através de qualquer método preferido.
- B. A amostra de DNA para usar para a análise de PCR-SSP deverá ser novamente suspensa em água estéril ou em Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 a 9.0, em uma concentração de 25–200 ng/µl com razão de A260/A280 de 1,65 a 1,80.
- C. As amostras não deverão ser novamente suspensas em soluções contendo agentes quelantes, como EDTA, com concentração superior a 0,5 mM.
- D. As amostras de DNA podem ser usadas imediatamente depois do isolamento ou armazenadas a -20° C durante longos períodos de tempo (mais de 1 ano) sem que ocorram efeitos adversos nos resultados.
- E. As amostras de DNA deverão ser transportadas à temperatura de 4° C, ou inferior, para se conservar a sua integridade durante o transporte.

PROCEDIMENTO

A. Materiais fornecidos

1. Placas de conjuntos de primers de DNA Micro SSP™
2. Tubos de D-mix previamente distribuídos em alíquotas (número adequado para o teste)
3. Selos da placa (número adequado para o teste)

B. Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Taq Polimerase recombinante (5 unidades/µl)
2. Pipetas, tais como: Pipetman® Gilson® P-20, Gilson® P200
3. Ponteiros descartáveis para o uso das pipetas
4. Agitador tipo Vórtex
5. Microcentrífuga
6. Suporte de placa e tampa para microtubos de placa de PCR. Selo de vedação para utilização na placa de PCR (Cat. #SSPPAD, SSPPAD384, SSPPADGRY). Utilizar o selo de vedação apenas no termociclador. Consultar Protocolo de Selo de vedação Micro SSP™ (EQ-PPAD-PI-EN-00)
NOTA: O selo de vedação é adequado para um máximo de 300 execuções de PCR. Por favor encomende um novo selo de vedação se a superfície do mesmo, que está em contato com o selo de placa, já não estiver macio.
7. Termociclador para PCR com formato de 96 poços e placa/retentor para tubos de reação de parede fina de 0,2 ml
8. Placa de aquecimento ou micro-ondas para aquecer as soluções de agarose

9. Aparelho de eletroforese/fonte de alimentação (capacidade mínima de 150V)
10. Transiluminador UV (Exemplo: Fotodyne™ FOTO/UV®21)
11. Sistema de documentação fotográfica ou de imagem
12. 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 (Cat. OLI # 5XTBE100)
13. Agarose com grau de eletroforese (Exemplo: FMC Seakem® LE)

C. Instruções de uso

1. Preparação da Amostra

- a. Purificar o DNA genômico a partir da amostra de leucócitos utilizando o método de escolha. A concentração final de DNA deverá ser de 25 a 200ng/µl (100ng/µl é ideal) com a razão A260/A280 entre 1,65 e 1,80.
- b. Para informações específicas sobre a preparação e armazenamento da amostra, consultar **Coleta e Preparação das Amostras** acima.
- c. Efetuar PCR na amostra de DNA purificada usando uma Placa de Tipagem de DNA Micro SSP™ HLA ou armazenar a amostra de DNA a -20° C ou menos, até estar preparado para a tipagem.

2. Preparação do Reagente/Equipamento

- a. Programar um termociclador para executar o programa de PCR da One Lambda. (Consultar "Requisitos do Instrumento" em cima.)
- b. Ter disponível: Taq polimerase recombinante (5 unidades/µl). Armazenar a -20°C.
- c. Preparar gel de eletroforese (agarose a 2,5%) utilizando o Sistema de Gel Micro SSP™ (N.º Cat. MGS108) ou com pelo menos 96 poços de amostra (filas de poços com pelo menos 1 cm de espaçamento).

3. Instruções para Pipetagem de Taq Polimerase

Os testes de controle de qualidade da One Lambda indicam que o volume que consta do rótulo da Taq polimerase é mais do que suficiente para o número de testes indicados neste produto. Se for necessária mais Taq, esta deve ser encomendada diretamente ao representante de F. Hoffmann-La Roche.

Para evitar desperdícios, por favor, siga as simples instruções para pipetagem da Taq polimerase.

NOTA: A Taq Polimerase é extremamente viscosa e deverá ter especial precaução no processo de elaboração das alíquotas. O não cumprimento dos passos que se descrevem a seguir poderá ocasionar a perda de reagente.

- a. Pipetar lentamente utilizando uma pipeta Gilson® Pipetman® calibrada. (Recomenda-se a utilização de uma pipeta Pipetman® P10 para maior precisão.)
- b. A ponta da pipeta deverá passar apenas na camada superficial da Taq.

Aviso: Não mergulhar a ponteira na Taq.

- c. Limpar cuidadosamente o excess de Taq da ponteira na margem do frasco.

4. Protocolo

- a. Remover da temperatura de armazenamento indicada: o tubo de D-Mix de Micro SSP™ e a placa de conjuntos de primers Micro SSP™ selecionada e as amostras de DNA. Descongelar à temperatura ambiente (de 20° a 25° C).

NOTA: Pode cortar a placa, dividindo-a na quantidade de testes necessários para uma única sessão de trabalho.

Repor imediatamente as porções não utilizadas na devida temperatura de armazenamento. Submeter as amostras de DNA ao agitador Vortex para misturar.

- b. Colocar a placa do conjunto de primers em um suporte de placa para microtubos (Robbins Scientific, Cat. #1044-39-5) e retirar o rótulo adesivo da placa.
- c. Retirar a Taq polimerase recombinante do congelador e manter em gelo até o uso.

- d. Utilizando uma pipeta Pipetman® (ou equivalente), acrescentar 1 µl de diluente de DNA no tubo de reação do controle negativo na placa de conjuntos de primers.
- e. Utilizando uma pipeta Pipetman® (ou equivalente), acrescentar a Taq polimerase recombinante (5 un/µl) no tubo de D-mix Micro SSP™. (Consultar a quantidade na Tabela de Referência do Produto Micro SSP™.)
- f. Tampar o tubo e submeter ao vórtex durante 5 segundos. Pulsar o tubo de Micro SSP™ D-mix em uma microcentrífuga para fazer com que todo o líquido desça das paredes do tubo.
- g. Utilizando uma pipeta P20 Pipetman® (ou equivalente), pipetar 9 µl de Micro SSP™ D-mix para o tubo de reação do controle negativo.
- h. Utilizando uma pipeta Pipetman® (ou equivalente), acrescentar a amostra de DNA ao tubo de Micro SSP™ D-mix. (Consultar a quantidade na Tabela de Referência do Produto Micro SSP™.)
- i. Tampar o tubo e submeter ao agitador durante 5 segundos. Pulsar o tubo de Micro SSP™ D-mix em uma microcentrífuga.
- j. Utilizando uma pipeta P20 Pipetman® ou uma pipeta eletrônica Pipetman®, colocar 10 µl desta mistura de “amostra-reação” do tubo de D-mix Micro SSP™ em cada tubo de reação da placa Micro SSP™, com exceção do tubo de reação de controle negativo.

Importante: Pipetar a amostra deslizando pela parede do tubo de reação, evitando pipetar no fundo do mesmo para não ocorrer a contaminação cruzada se a ponteira encostar no fundo (aonde estão os primers). Verificar se todas as amostras desceram para o fundo de cada tubo. Caso contrário, dar leves batidas na placa sobre a bancada para que todas as amostras assentem no fundo do tubo antes de iniciar a PCR.

- k. Tampar os tubos de reação com os selos de placa fornecidos. Verificar se todos os tubos de reação estão completamente selados para assegurar e prevenir perdas por evaporação durante a PCR.
 - l. Colocar a placa do conjunto de primers Micro SSP™ no termociclador.
 - m. Colocar o selo de vedação em cima da placa com o lado que tem textura para cima antes de fechar a tampa do termociclador. (Consultar o Protocolo do selo de vedação do Micro SSP™ para instruções sobre o selo específico para usar com o seu termociclador.)
 - n. Selecionar o programa de PCR Micro SSP™. Especificar o volume de reação de 10 µl.
 - o. Iniciar o programa de PCR. O programa demora aproximadamente 1 hora e 16 minutos. O último passo irá manter a amostra a 4° C até que a execução seja interrompida.
 - p. Retirar a placa do conjunto de primers do termociclador. Cuidadosamente remover o selo da placa sem espirrar as amostras. Ou armazenar as amostras na placa do conjunto de primers a -20° C, ou menos, para posterior eletroforese em gel.
 - q. Transferir 10µl de cada reação de PCR em sequência para o gel de agarose a 2,5% no Sistema de Gel Micro SSP™ (N.º Cat. OLI #MGS108). (A utilização de uma pipeta Pipetman® de 8 ou 12 canais ou de um dispositivo de transferência de 96 poços (N.º Cat. #TRNDV96) é altamente recomendável.)
- Observação:** Certifique-se de transferir todas as amostras na sequência correta, seguindo a placa do conjunto de primers com o poço de reação do controle negativo no canto superior esquerdo. A ordem das amostras (para corresponder à folha de trabalho) é da esquerda para a direita, de cima para baixo. Não é necessário acrescentar qualquer corante para eletroforese.
- r. Submeter as amostras a eletroforese a 140-150 volts até que o corante de rastreamento vermelho tenha migrado aproximadamente 0,5 cm no gel (cerca de 3 a 5 minutos, dependendo da agarose utilizada).
 - s. Fotografar o gel num transiluminador UV.

NOTA: Quando as placas de tipagem de DNA da One Lambda ocupam apenas algumas filas do gel de eletroforese, é possível colocar várias amostras em um gel. As posições das amostras no gel devem ser registradas com cuidado.

RESULTADOS

- Interpretar os resultados da tipagem utilizando a folha de trabalho fornecida com as placas ou com auxílio do software para HLA disponibilizado pela One Lambda, Inc.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- O PCR-SSP consiste num processo dinâmico exigindo condições altamente controladas que visam garantir uma amplificação discriminatória. O procedimento fornecido neste produto deve ser estritamente cumprido.
- A amostra de DNA extraído fornece um molde para o processo de amplificação específico e, portanto, terá que apresentar uma concentração e pureza dentro dos intervalos especificados no procedimento.
- Todos os instrumentos (por exemplo, máquina de PCR, pipetas) devem ser calibrados de acordo com as recomendações do fabricante. Para obter informações específicas sobre o lote, consultar o documento Limitações de Resolução.
- Para obter informações específicas sobre o lote, consultar o documento Limitações de Resolução.
- Devido à complexidade das definições alélicas HLA, um técnico ou especialista de HLA deve analisar e interpretar os dados, e atribuir a tipificação HLA.
- Este teste não deve ser utilizado como a única base para tomar uma decisão clínica.

VALORES ESPERADOS

A. Análise de dados

1. Será visível uma banda de controle interno (de migração mais lenta) nos poços negativos (exceto no poço do controle negativo), como um controle de amplificação. A não amplificação de qualquer poço poderá tornar os resultados do teste inválidos.
2. Se um gene HLA específico tiver sido amplificado durante a PCR, será observada uma banda de migração mais rápida no gel de eletroforese. Isso indica um resultado positivo.
3. A banda de controle interno pode ser fraca ou ausente nos poços positivos.
4. Comparando o padrão de poços positivos com as informações na folha de trabalho Micro SSP™ obtém a tipagem HLA do DNA da amostra.
5. A presença da banda de controle interno e/ou da banda de tipagem positiva no poço de controle negativo invalida todos os resultados do teste.
6. Análise opcional – Software HLA Fusion™.

B. Interpretação do Gel*

	Reação <input type="checkbox"/> positiva	Reação <input type="checkbox"/> negativa	Não <input type="checkbox"/> amplificação
Poço			
Banda do controle interno			
Banda de tipagem positiva			
Banda de primer			

*A banda de controle interno e a banda de primer (banda difusa de primers não incorporados) atuam como marcadores. Qualquer banda visível entre os dois marcadores devem ser considerados como banda de tipagem positiva.

C. Resolução de problemas

Problema	Possíveis causas	Soluções	
Ausência de bandas ou bandas fracas	DNA	Não foi utilizado o suficiente Não está de acordo com a razão A260/A280 estabelecida (1,65 -1,80) Presença de inibidor de PCR (por exemplo, EDTA acima de 0,5 mM)	Repetir o teste; utilize a quantidade indicada no Quadro de Referência do Produto Micro SSP™ . Repetir a preparação de DNA; verifique se a razão A260/A280 está dentro de 1,65-1,80 e depois repeta o teste. Repetir a preparação de DNA; volte a suspender o DNA em solução com EDTA < 0,5 mM, depois repita o teste.
	Taq Polimerase recombinante	Não utilizado o suficiente Enzima degradada	Repita o teste; utilize a quantidade indicada no Quadro de Referência do Produto Micro SSP™ . Repita o teste; use um tubo novo de enzima.
	EtBr	Não utilizado o suficiente	Refaça TBE 1X com EtBr a 0,5 µg/ml. Repita o teste.
	Selo de vedação	Selo de vedação desgastado	Troque o selo de vedação após 300 execuções de PCR.
Bandas falsas	DNA	Muito concentrado For a da razão A260/A280 (1,65–1,80) não está dentro de 1,65–1,80) Contaminado (com produto de DNA ou PCR)	Repita o teste; utilize a quantidade indicada no Quadro de Referência do Produto Micro SSP™ . Repeta a preparação de DNA; verifique se a razão A260/A280 está entre 1,65-1,80 e depois repita o teste. Repita a extração de DNA e PCR; use novas alíquotas de todos os reagentes para extração de DNA e PCR;
	Taq Polimerase recombinante	Muito concentrado, pipetagem maior que o protocol preconiza	Repita o teste; utilize a quantidade indicada no Quadro de Referência do Produto Micro SSP™ .
	EtBr	Muito concentrado, pipetagem maior que o protocol preconiza	Refaça TBE 1X com EtBr a 0,5 µg/ml. Repita o teste.
Bandas no controle negativo	Reagentes	Contaminado (com produto de DNA ou PCR)	Repita a extração de DNA e a PCR; use novas alíquotas de todos os reagentes para extração de DNA e PCR.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

Foi realizada uma comparação entre as metodologias de tipagem de HLA Micro SSP™ e sorologia visando avaliar a precisão do sistema de tipagem Micro SSP™ HLA. Nesta comparação, foram aleatoriamente coletadas oitenta e uma amostras de sangue total e analisadas para tipagem de HLA de Classe II utilizando a HLA Class II Tissue Typing Tray DR72F e a Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray da One Lambda, Inc.. Os resultados mostraram uma concordância de 96% (78/81) entre os dois métodos. A tabela a seguir representa o número total de vezes em que cada especificidade foi determinada pelos dois métodos diferentes. (Os resultados destacados indicam discordância entre os dois métodos.)

Grupos de alelos	DR 72 Sorologia	Micro SSP™
DRB1*01	12	12
DRB1*15	24	24
DRB1*16	2	2
DRB1*0301, 0304	6	6
DRB1*0302, 0303	6	6
DRB1*04	14	14
DRB1*11	23 ^a	24
DRB1*12	5	5
DRB1*13	17	17
DRB1*14	11 ^b	10
DRB1*07	16	16
DRB1*08	7	7
DRB1*09	5	5
DRB1*10	5	5
DRB5*	26	26
DRB3*	57 ^c	56
DRB4*	32 ^d	33
DQB1*05	34	34
DQB1*06	32	32
DQB1*02	24	24
DQB1*0301, 0304	22	22
DQB1*0302, 0304	11	11
DQB1*0303	3	3
DQB1*04	11	11

- ^{a, b} As discrepâncias em DRB1*11 e DRB1*14 baseiam-se numa amostra na qual a sorologia determinou como DRB1*14 enquanto que o DNA foi determinado como DRB1*1117. Os reagentes sorológicos DRB1*14 são anticorpos monoclonais para detectar o epítipo ³¹FHNQEEF³⁷ com o padrão de análise dos alelos do DRB1*14. Esta sequência de aminoácido também é compartilhada com DRB1*1117 (baseado na publicação de sequência de aminoácidos).
- ^c A discordância em DRB3 baseia-se numa amostra a que foi determinada como homocigota para DRB1*08 por sorologia e DNA, mas a que foi determinado um DRB3 adicional por sorologia. DRB1*08 e DRB3 compartilham sequências de aminoácidos que, sob o efeito de dose dupla de homocigose DRB1*08 podem ocorrer reações sorológicas falsas positivas.⁶
- ^d A discordância de falso negativo em DRB4 baseia-se em uma amostra à qual só por tipagem de DNA determinou como DRB4. As determinações por sorologia e tipagem de DNA mostram que esta amostra contém o haplótipo DR7-DQ9, que é conhecido por não apresentar expressão do alelo DRB4 a nível proteico.⁷

OBSERVAÇÃO: Os dados de desempenho específicos de lote estão disponíveis quando solicitados.

BIBLIOGRAFIA

1. Terasaki, P.I., Bernoco, F., Park, M.S., Ozturk, G. e Iwaki, Y. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. American Journal of Clinical Pathology 69:103-120, 1978.

2. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C. e Markham, A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* 17: 2503-2516, 1989.
3. Slater, R.D. e Parham, P. Mutually exclusive public epitopes of HLA-A,B,C Molecules. *Human Immunology* 26: 85-89, 1989.
4. Bodmer J., Marsh S., Albert E., Bodmer W., Bontrop R., Charron D., Dupont B., Erlich H., Mach B., Mayr W., Parham P., Sasazuki T., Schreuder G., Strominger J., Svejgaard A. e Terasaki P. Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Human Immunology* 43:149-164, 1995.
5. Terasaki, P.I. *Histocompatibility Testing*, 1980. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California.
6. Savage, D.A., Bidwell, J.L., Cullen, C., Bidwell, E.A. e Middleton, D. Identification of HLA-DRw52 associated antigens using HLA class II allo genotyping. *Tissue Antigens* 32: 278-285, 1988.
7. Sutton, V.R., Kienzle, B.K. e Knowles, R.W. An altered splice site is found in the DRB4 gene that is not expressed in HLA-DR7, Dw11 individuals. *Immunogenetics* 29: 317-322, 1989.

MARCAS REGISTRADAS E ISENÇÕES DE RESPONSABILIDADES

AVISO

Os reagentes de tipagem de DNA Micro SSP™ são fabricados e distribuídos por One Lambda, Inc., 22801 Roscoe Blvd. West Hills, CA 91304, EUA. A Taq polimerase recombinante é fabricada por F. Hoffmann-LaRoche.

REPRESENTANTE BRASILEIRO AUTORIZADO

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: suporte@biometrix.com.br Website: www.biometrix.com.br

CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

One Lambda, Inc.

22801 Roscoe Blvd

West Hills – CA – EUA

REGISTRO ANVISA

802998490006

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Giuliana Reis Clementi Pacheco

CRBio: 83.440/07D

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
REF	Número de Catálogo
IVD	Diagnóstico in-vitro

	Consultar as instruções de uso
	Aviso, consultar os documentos inclusos
	Riscos biológicos
	Limitação de temperatura
	Marca CE
	Marca CE de qualidade médica
	Fabricante
	Representante autorizado no Brasil

HISTÓRICO DE REVISÕES

Revisão	Data	Descrição da Revisão
20	03/19/2019	Adicione esclarecimentos à secção de resultados. Mova a tabela na secção de resultados para a Secção Características Específicas de Desempenho
01	04/08/2019	Sistema de Controlo de Documentos Internos Atualizado. Sem alterações ao conteúdo do documento.
02	Em vigor	<p>Atualize o IFU para incluir instruções “Devido à complexidade das definições alélicas do HLA, um técnico ou especialista certificado em HLA deve analisar e interpretar os dados e atribuir a tipologia do HLA.</p> <p>Este teste não deve ser usado como a única base para tomar uma decisão clínica”.</p> <p>Informações e morada de contacto atualizados para refletir a alteração no local legal de fabricação.</p>



*0197 aplica-se apenas aos produtos da Lista B do Anexo II.