

Teste de Tipagem HLA por DNA Micro SSP Genérico (Baixa e Média Resolução) Classes I e II

- REF** Catálogo: Consultar Micro SSP™ Product Reference Table para números de catálogo, componentes e requisitos específicos do produto.
- IVD** Para Uso em Diagnóstico In Vitro.

USO PRETENDIDO



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

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Historicamente, o método estabelecido para a determinação de antígenos HLA tem sido o teste de linfocitotoxicidade¹. Entretanto, com o advento das tecnologias de PCR, técnicas de tipagem baseadas em DNA tornaram-se rotineiras em laboratório. Para a maioria dessas metodologias, o processo de PCR é usado apenas como uma etapa de amplificação para adquirir o DNA alvo necessário. O processo de tipagem HLA requer um passo de pós-amplificação para discriminar os diferentes alelos (por exemplo, RFLP, SSOP, *dot blot* reverso). Diferentemente de outros métodos baseados em PCR, a metodologia SSP empregada no teste Micro SSP™ da One Lambda discrimina os diferentes alelos durante o processo de PCR². Isso reduz o tempo de processamento pós-amplificação para uma simples etapa de detecção por eletroforese em gel. Em contraste com a escala de reação à linfocitotoxicidade (1 = negativo a 8 = positivo), os resultados do teste Micro SSP™ são positivos ou negativos. Isso elimina a necessidade de interpretação complicada dos resultados. Além disso, alterações de nucleotídeo único podem ser discriminatórias em PCR-SSP, enquanto grupos de reação cruzada (CREGs) fornecem grandes desafios para a tipagem sorológica³. Finalmente, devido à natureza sintética dos reagentes de tipagem de DNA (por exemplo, primers oligonucleotídicos), a estabilidade foi bastante melhorada e a variação de lote para lote foi reduzida.

PRINCÍPIO(S)

A metodologia de PCR-SSP baseia-se no princípio de que numa reação com Taq polimerase recombinante, os *primers* de oligonucleotídeos com correspondência completa são utilizados de forma mais eficaz na amplificação de uma sequência alvo do que um primer sem essa correspondência. Os pares de primers são projetados para ter combinações perfeitas apenas com um único alelo ou grupo de alelos. Sob condições estritamente controladas de PCR, pares de primers perfeitamente combinados resultam na amplificação de sequências alvo (isto é, um resultado positivo) enquanto pares de primers desemparelhados não resultam em amplificação (isto é, um resultado negativo). Após o 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 à luz ultravioleta. A interpretação dos resultados da PCR-SSP é baseada na presença ou ausência de um fragmento específico de DNA amplificado. Uma vez que a amplificação durante a reação de PCR pode ser adversamente afetada por vários fatores (erros de pipetagem, baixa qualidade do DNA, presença de inibidores, etc.), um par de primers de controle interno é incluído em cada reação 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 verificar a integridade da reação de PCR. Na presença de uma banda de tipagem positiva (amplificação específica de um alelo HLA), a banda do controle interno pode ser fraca ou ausente devido às diferenças de concentração e temperaturas de fusão entre os pares de primers específicos HLA e os de controle interno.



Os fragmentos de DNA amplificados pelos primers HLA-específicos são menores do que o produto do primer de controle interno, mas são maiores do que a banda de primers difusa e não incorporada. Assim, uma reação positiva para um alelo ou grupo de alelos de HLA específico é visualizada no gel como um fragmento amplificado entre a banda do controle interno e a banda de primer não incorporada (**ver Valores Esperados / Interpretação de Gel**).

REAGENTES

A. Identificação

Os Testes de Tipagem HLA por DNA Micro SSP Genérico fornecem primers de oligonucleotídeos sequência- específicos para amplificação de alelos HLA e do gene da β -globina humana através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Primers pré-otimizados estão presentes (liofilizados) em diferentes poços de uma placa de PCR com 96 poços de 0,2 ml, e estão prontos para a adição de amostras de DNA, Taq polimerase recombinante e mistura de tampão dNTP especialmente formulada (*Micro SSP™ D-mix*). Cada placa possui um poço de reação de controle negativo que detecta a presença do produto de PCR de controle interno. Esse é o produto de PCR com maior probabilidade de contaminação devido à sua amplificação em todos os poços. A quantidade de cada primer é ajustada para a amplificação ótima de 100 ng de DNA da amostra quando usado em conjunto com: *Micro SSP™ D-mix*, quantidade prescrita de Taq polimerase recombinante e o protocolo de reação PCR detalhado neste documento (página 2). Para saber quais alelos específicos podem ser amplificados por cada conjunto de primers, consultar as *worksheets* específicas. Para localizações de primer lote-específicos, consultar o documento *Primer Information*.

IVD

B. Advertência ou Precaução

1. Designação FDA: IVD
2. **Aviso:** As pipetas usadas para manipulações pós-PCR **não** devem ser usadas para manipulações **pré**-PCR.
3. **Aviso:** Risco biológico: O brometo de etídio utilizado para a coloração do DNA é um potencial cancerígeno. Use sempre luvas ao manusear géis corados.
4. **Aviso:** Risco biológico: Todos os produtos derivados do sangue devem ser tratados como potencialmente infecciosos. O material de origem do qual este produto foi derivado foi considerado negativo quando testado de acordo com os testes atuais exigidos pela FDA. Nenhum método de teste conhecido pode garantir que produtos derivados de sangue humano não transmitam agentes infecciosos
5. **Cuidado:** Use óculos de proteção UV e não visualize diretamente a fonte de luz UV ao visualizar ou fotografar géis.
6. Consultar a FISPQ para obter informações detalhadas.



C. Preparando Reagentes para Uso

1. Veja **Instruções de Uso**.

D. Instruções de Armazenamento

Armazene os reagentes à temperatura indicada na embalagem. Use antes da data de validade impressa.

E. Purificação ou Tratamento Necessário para Uso Veja **Instruções de Uso**.

F. Indicações de Instabilidade

1. Não use placas com rachaduras nos poços ou nas bordas. Rachaduras podem causar perdas por evaporação.
2. Se houver precipitação de sais nos frascos de *D-mix* durante o transporte ou armazenamento, ressuspenda-os por agitação prolongada em vortex à temperatura ambiente (20°C - 25°C).
3. O reagente *D-mix*, após descongelamento à temperatura ambiente (20°C - 25°C), deve ser da cor rosa a roxo claro. Qualquer alíquota de *D-mix* sem a coloração especificada deve ser considerada inutilizável.

REQUISITOS DE EQUIPAMENTOS**A. Programação do termociclador**

Utilizar termociclador modelo *96-Well GeneAmp® PCR System 9600, 9700, Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) ou equivalente. Definir a velocidade de rampa em 9600 para modelo *96-Well GeneAmp® PCR System 9600, 9700*. Defina a velocidade da rampa em 9600 Emulation Mode para o *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler*. Programar o termociclador antes de iniciar o “Procedimento Passo-a-Passo”, mais abaixo.

Programa PCR One Lambda (OLI-1)

<u>Nº Ciclos</u>	<u>Passo</u>	<u>Temp. (°C)</u>	<u>Tempo (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 sobre o termociclador, consultar o manual do fabricante.

B. Preparo de gel de agarose a 2,5%

(Para sistema *Micro SSP™ Gel System*, OLI Cat. MGS108)

1. Para montar:
 - a. Deslizar o pino de travamento na base para abertura.
 - b. Inserir o suporte de gel na base combinando os lados codificados por cores, garantindo assim a orientação adequada.
 - c. Travar o suporte de gel na base deslizando o pino de travamento.
 - d. Nivelar a base com o auxílio da bolha niveladora e dos três pés ajustáveis.
2. Posicionar e inserir completamente os 14 pentes de gel no suporte.
3. Adicionar 2,5 g de agarose de eletroforese em 100 ml de TBE 1X (EDTA Tris borato) com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (utilizar um frasco de vidro de 500 ml). Aquecer até formar uma solução homogênea.
4. Adicionar 30 ml da solução de gel ao suporte de gel. Certificar-se que a agarose cubra uniformemente toda a superfície, inclinando o suporte para frente e para trás imediatamente após a solução de gel ser adicionada. Colocar rapidamente o suporte com os pentes, combinando o código de cores. Deixar por 15 minutos.
5. Remover os pentes de gel levantando o suporte enquanto segura a base. Adicionar uniformemente 10 ml de TBE 1x contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, de modo a preencher cada poço.

C. Gel de Eletroforese

(Para o sistema *Micro SSP™ Gel System*, OLI Cat. MGS108)

1. Depois de completar a reação de PCR:
 - Posicionar a placa e o suporte de gel de modo que o controle negativo fique no canto superior esquerdo.
 - Remover com cuidado o selo da placa, sem contaminar as amostras.
2. Transferir cada reação de PCR (10 µl) para o gel de agarose a 2,5%. Certificar-se de transferir todas as amostras na sequência correta. (Não é necessária nenhuma adição de corante de eletroforese) Recomenda-se o uso de uma pipeta Pipetman® de 8 ou 12 canais.

NOTA: A ordem das amostras (para corresponder à worksheet) é da esquerda para a direita, de cima

para baixo.

3. Cobrir o suporte do gel com a tampa ligada à fonte, combinando os lados codificados por cores. Realizar a eletroforese a 140 - 150 volts até que o corante de rastreamento tenha migrado cerca de 0,5 cm para fora do ponto de aplicação (aproximadamente 3 - 5 minutos, dependendo da agarose utilizada). Retire a tampa.
4. Deslizar o pino de travamento na base para abrir e remover o suporte de gel. Transferir o suporte para um transiluminador UV. Fotografar o gel completo.
5. Orientar a fotografia com a reação de controle negativo no canto superior esquerdo e marcar os grupos de alelos positivos correspondentes na *worksheet* da respectiva placa.

COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS

- A. O DNA pode ser purificado a partir de leucócitos humanos por qualquer método preferido.
- B. A amostra de DNA a ser usada para análise PCR-SSP deve ser ressuspensa em água ultrapura ou em de Tris- HCl 10 mM, pH 8.0 - 9.0. A concentração deverá ser de 25 - 200 ng/μl com a proporção A260/A280 de 1.65 - 1.80.
- C. As amostras não devem ser ressuspensas em soluções contendo agentes quelantes, como o EDTA, acima de 0,5 mM de concentração.
- D. As amostras de DNA podem ser utilizadas imediatamente após a extração ou armazenadas a -20°C durante períodos de tempo prolongados (mais de 1 ano) sem efeitos adversos nos resultados.
- E. As amostras de DNA devem ser transportadas a 4° C ou menos para preservar sua integridade durante o transporte.

PROCEDIMENTO

A. Materiais Fornecidos

1. Teste de Tipagem HLA por DNA Micro SSP Genérico contendo do conjunto de primers
2. Tubos de *D-mix* pré-aliquotados (quantidade apropriada para teste)
3. Selos (quantidade apropriada para teste)

B. Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Taq polymerase recombinante (5 unidades/μl)
2. Dispositivos de pipetagem, para volumes de 20uL, 200uL que possuam segurança quanto a precisão e exatidão.
3. Ponteiras descartáveis para as pipetas
4. Agitador Vortex
5. Micro centrífuga
6. Suporte para placas de PCR, racks e selos de borracha para termociclador (Cat. OLI SSPPAD, SSPPAD384, SSPPADGRY). Usar somente o selo de borracha específico para o seu modelo de termociclador. Consultar documento *Micro SSP™ Pressure Pad Protocol (EQ-PPAD-PI-EN-00)*
NOTA: o selo de borracha é bom para um máximo de 300 execuções de PCR. Por favor, peça um novo selo se a superfície que entra em contato com o selo da placa não estiver mais regular.
7. Termociclador com bloco de 96 poços para tubos de reação de 0,2 ml de parede fina
8. Forno de micro-ondas ou similar para aquecimento de soluções de agarose
9. Aparelho de eletroforese/fonte de energia (mínimo 150V de capacidade)
10. Transiluminador UV (um modelo que serve como exemplo: Fotodyne™ FOTO/UV®21)
11. Sistema de documentação de imagem
12. Tampão TBE 1X (Tris-borate 89mM; EDTA dissódico 2 mM, pH 8.0) com 0,5 μg/ml brometo de etídio ou TBE 5X com brometo de etídio (OLI Cat. 5XTBE100)
13. Agarose grau de eletroforese (e.g., FMC Seakem® LE)

C. Instruções de Uso

1. Preparo da Amostra

- Purificar o DNA genômico da amostra de leucócitos pelo método de escolha. A concentração final de DNA deve ser 25 - 200 ng/μl (100 ng /μl é ideal) com a relação A260 / A280 entre 1,65-1,80.
- Para obter informações específicas sobre Preparo e armazenamento de amostras, consulte **Coleta e Preparo de Amostras** acima.
- Realizar a PCR da amostra de DNA purificada usando Teste de Tipagem HLA por DNA Micro SSP Genérico, ou armazenar a amostra a -20°C até o momento do teste.

2. Preparo de Reagente/Equipamento

- Programar o termociclador para executar o programa de PCR. (Consulte “Requisitos de Equipamento” acima.)
- Ter disponível: Taq polimerase recombinante (5 unidades/μl). Armazenar a -20° C.
- Preparar o gel de eletroforese (agarose a 2,5%) usando o sistema de gel Micro SSP™ (Cat. MGS108) ou com pelo menos 96 cavidades de amostra (fileiras de poços com intervalos de pelo menos 1 cm).

Instruções para Pipetar Taq Polimerase

Os testes de controle de qualidade da One Lambda indicam que o volume mostrado na etiqueta da Taq Polimerase é mais do que suficiente para os números de testes indicados no produto. Se for necessário adicionar mais Taq, é necessário solicitar ao representante.

Para evitar o desperdício, seguir as 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. Não seguir os passos descritos abaixo pode resultar em perda de reagente.

- Pipetar lentamente, usando uma pipeta calibrada de 10μL (pipetas que possuam segurança quanto a precisão e exatidão).
- A ponteira deve passar apenas pela camada superficial da Taq.

Aviso: Não mergulhar a ponteira na Taq

- Limpe cuidadosamente o excesso de Taq da ponteira na borda do frasco.

3. Procedimento Passo a Passo

- Retirar do freezer a quantidade necessária de Testes de Tipagem HLA por DNA Micro SSP Genérico específicos, frascos de D-Mix correspondentes ao kit e as amostras de DNA. Descongelar à temperatura ambiente (20 - 25°C).

NOTA: É possível cortar a placa e o selo na quantidade de testes necessários para uma única sessão de trabalho. Imediatamente retornar ao freezer as porções não usadas. Homogeneizar as amostras de DNA no vortex.
- Colocar a placa em um suporte para placa de PCR (suporte plástico) e remover o selo.
- Retirar a Taq polimerase do freezer e manter no gelo até o momento do uso.
- Usando uma pipeta, adicionar 1 μl de diluente de DNA (água ultrapura ou similar) ao poço controle negativo na placa.
- Usando uma pipeta, adicionar Taq polimerase recombinante (5 unidades/μl) ao tubo de *D-mix*. Para saber o volume a ser adicionado, consultar a tabela de referência no documento *Micro SSP™ Product Reference Table*.
- Fechar o microtubo e agitar no vortex durante 5 segundos. Fazer um breve *spin* em uma microcentrífuga para retirar todo o líquido das paredes do tubo.
- Usando uma pipeta de 20uL, pipetar 9 μl da mistura de *D-mix* no poço controle negativo.
- Usando uma pipeta, adicionar a amostra de DNA ao tubo com a mistura de Taq e *D-mix*. Para saber o volume a ser adicionado, consultar a tabela de referência no documento *Micro SSP™ Product Reference Table*.
- Fechar o microtubo e agitar no vortex durante 5 segundos. Fazer um breve *spin* em uma microcentrífuga para retirar todo o líquido das paredes do tubo.

- j. Usando uma pipeta de 20 μ L ou uma pipeta eletrônica, dispensar 10 μ L da mistura de Dmix/amostra em cada poço da placa, exceto no poço do controle negativo.
Importante: *Certificar-se de dispensar a amostra acima dos primers (secos no fundo de cada poço da placa) para evitar a contaminação cruzada entre os tubos. Toque na parede interna do tubo com a ponteira para permitir que a amostra deslize até o fundo do poço. Verifique se todas as amostras deslizaram para o fundo. Caso contrário, bata cuidadosamente a placa na bancada de modo que todas as amostras assentem na parte inferior dos poços antes de iniciar a PCR.*
- k. Fechar a placa com o selo fornecido no kit. Verificar se todos os poços de reação estão completamente cobertos pelo selo, para assegurar a vedação completa e evitar perda por evaporação durante a PCR.
- l. Colocar a placa *Micro SSP™* no termociclador.
- m. Coloque um selo de borracha na parte superior da placa com o lado texturizado para cima antes de fechar a tampa do termociclador. (Consultar documento *Micro SSP™ Pressure Pad Protocol* para obter instruções sobre a borracha específica a ser usada com o seu termociclador.)
- n. Digitar o número do programa de PCR do *Micro SSP™*. Especificar o volume de reação de 10 μ L.
- o. Iniciar o programa de PCR. O programa leva aproximadamente 1 hora e 16 minutos. O último passo manterá a amostra a 4°C até a interrupção do usuário. Retirar a placa do termociclador.
- p. Remover com cuidado o selo da placa sem espirrar as amostras. Ou, armazenar a placa -20°C (ou abaixo) para posterior eletroforese em gel.
- q. Transferir cada reação de PCR (10 μ L) em sequência para um gel de agarose a 2,5% no sistema *Micro SSP™ Gel* (OLI Cat. # MGS108). (O uso de uma pipeta de 8 ou 12 canais ou do Dispositivo de Transferência de 96 poços (OLI Cat. TRNDV96) é altamente recomendado.)
Nota: Certifique-se de transferir todas as amostras na sequência adequada, orientando a placa com a reação controle negativo no canto superior esquerdo. A ordem das amostras (para corresponder à *worksheet*) é da esquerda para a direita, de cima para baixo. Nenhuma adição de corante de eletroforese é necessária.
- r. Realizar a eletroforese das amostras a 140 - 150 volts até o corante de rastreamento ter migrado cerca de 0,5 cm para fora do ponto de aplicação (aproximadamente 3 a 5 minutos, dependendo da agarose usada).
- s. Fotografar o gel em um transiluminador UV.

NOTA: *Quando as placas de tipagem One Lambda preenchem apenas algumas fileiras do gel de eletroforese, é possível colocar várias amostras em um gel. Deve-se ter cuidado para registrar as posições da amostra no gel.*

RESULTADOS

- Interpretar os resultados de tipagem usando a *worksheet* fornecida com as placas ou com a auxílio do software para HLA disponibilizado pela One Lambda, Inc.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- O PCR-SSP é um processo dinâmico que requer condições altamente controladas para garantir a amplificação discriminatória. O procedimento previsto neste documento deve ser rigorosamente seguido.
- O DNA da amostra extraída fornece o molde para o processo específico de amplificação e, portanto, deve ter concentração e pureza dentro das faixas especificadas no procedimento.
- Todos os equipamentos (por exemplo, termociclador, dispositivos de pipetagem) devem ser calibrados de acordo com as recomendações do fabricante. Para informações específicas de lote, consulte o documento *Limitações da Resolução*.
- Para informações específicas de lote dos kits *Micro SSP™*, consulte o documento *Resolution Limitations*.
- Devido à complexidade das definições alélicas HLA, um especialista ou técnico certificado em HLA deverá revisar e interpretar os dados, definindo a tipagem HLA final.
- Este teste não deve ser usado como base exclusiva (única) para realizar uma decisão clínica.

VALORES ESPERADOS

A. Análise de Dados

1. Uma banda de controle interno (migração lenta) deve sempre ser visível em poços negativos (exceto no poço de controle negativo) como um controle para uma amplificação bem-sucedida. A não amplificação de qualquer poço pode anular os resultados do teste.
2. Uma banda positiva de migração mais rápida será observada no gel se um gene HLA específico for amplificado durante a PCR. Isso indica um resultado positivo no teste.
3. A banda de controle interno pode estar fraca ou ausente em poços positivos.
4. Combinar o padrão de poços positivos com as informações na *worksheet* Micro SSP™ para obter a tipagem HLA do DNA da amostra.
5. A presença da banda de controle interno e/ou banda de tipagem positiva no poço de controle negativo anula todos os resultados do teste.
6. Análise opcional - Software HLA Fusion™.

B. Interpretação de Gel

Poço	Reação Positiva	Reação Negativa	Sem Amplificação
Banda Controle Interno			
Banda de Tipagem Positiva			
Difusão de Primer			

* A banda de controle interno e a banda de primer não incorporado servem como marcadores de tamanho. Qualquer banda visível entre os dois marcadores deve ser considerada como banda de tipagem positiva.

C. Solução de problemas

Problema	Causa Potencial		Soluções
Nenhuma banda ou bandas fracas	DNA	Não foi usado o suficiente	Repetir o teste; utilizar a quantidade indicada no documento Micro SSP™ Product Reference Table
		Pureza insuficiente (A260/A280 fora da faixa de 1,65 – 1,80)	Repetir o preparo do DNA; checar se A/260/A280 está entre 1,65 – 1,80 e repetir o teste
		Presença de inibidor (ex.: EDTA acima de 0,5mM)	Repetir o preparo do DNA; ressuspender o DNA em solução com EDTA < 0,5mM e repetir o teste
	Taq Polimerase Recombinante	Não foi usado o suficiente	Repetir o teste; utilizar a quantidade indicada no documento Micro SSP™ Product Reference Table
		Enzima degradada	Repetir o teste; usar novo frasco de enzima
	EtBr	Não foi usado o suficiente	Refazer o TBE 1X com EtBr na concentração de 0,5µg/ml e repetir o teste.
	Selo de borracha do termociclador	Selo desgastado	Trocar o selo do termociclador após 300 corridas de PCR
Bandas falsas	DNA	Muita quantidade usada	Repetir o teste; utilizar a quantidade indicada no documento

		Pureza insuficiente (A260/A280 fora da faixa de 1,65 – 1,80)	Micro SSP™ Product Reference Table Repetir o preparo do DNA; checar se A/260/A280 está entre 1,65 – 1,80 e repetir o teste Usar novas alíquotas de todos os reagentes da extração de DNA e de PCR; Repetir a extração e o teste.
	Taq Polimerase Recombinante	Muita quantidade usada	
	EtBr	Muita quantidade usada	
Bandas no Controle Negativo	Reagentes	Contaminação (por outro DNA ou produto de PCR)	Usar novas alíquotas de todos os reagentes da extração de DNA e de PCR; Repetir a extração e o teste.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

Foi realizada uma comparação entre as metodologias de tipagem HLA pelos métodos *Micro SSP™* e sorológico para avaliar a precisão do sistema de tipagem *Micro SSP™*. Nesta comparação, oitenta e uma amostras aleatórias de sangue total foram coletadas e analisadas para tipagem HLA Classe II usando a placa de Tipagem (*Tissue Typing Tray HLA Class II*) DR72F da One Lambda, e a placa genérica *Micro SSP™* de Classe II (*Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray*). Os resultados mostram uma concordância de 96% (78/81) entre os dois métodos. A tabela a seguir representa o número total de vezes que cada especificidade foi atribuída pelos dois métodos diferentes. (Resultados destacados indicam discordância entre os dois métodos.)

Grupos de Alelos	DR 72 Serology	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 são baseadas em uma amostra na qual a sorologia atribuiu um DRB1*14 enquanto a tipagem de DNA atribuiu DRB1*1117. Os reagentes sorológicos DRB1*14 são anticorpos monoclonais os quais espera-se que detectem o epítipo ³¹FHNQEEF³⁷ com base na análise de padrões com alelos DRB1*14. Esta sequência de aminoácidos também é compartilhada com DRB1*1117 (com base em sequências de aminoácidos publicadas).
- c A discordância no DRB3 é baseada em uma amostra determinada como DRB1*08 homocigoto pelas duas metodologias, mas à qual a sorologia atribuiu também um DRB3*. DRB1*08 e DRB3* compartilham sequências de aminoácidos que, devido à homocigose DRB1*08, podem gerar reações sorológicas falso-positivas.⁶
- d A discordância de falso negativo no DRB4 é baseada em uma amostra na qual apenas a tipagem molecular determinou um DRB4. Essa amostra contém o haplótipo DR7-DQ9, atribuído por sorologia e tipagem molecular. Esse haplótipo é conhecido por não ter expressão do alelo DRB4 ao nível da proteína.⁷

NOTA: Dados de desempenho específicos do lote estão disponíveis mediante solicitação.

BIBLIOGRAFIA

1. Terasaki, P.I., Bernoco, F., Park, M.S., Ozturk, G., and 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., and 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. and 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. and 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., and Middleton, D. Identification of HLA-DRw52 associated antigens using HLA class II allogenotyping. Tissue Antigens 32: 278-285, 1988.
7. Sutton, V.R., Kienzle, B.K., and 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 E ISENÇÕES DE RESPONSABILIDADE

AVISO

Os reagentes de tipagem de DNA Micro SSP™ fabricados e distribuídos por One Lambda, Inc., 22801 Roscoe Blvd., West Hills, CA 91304, E.U.A. A polimerase Taq recombinante produzida 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

80298490141

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
	Número de catálogo
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Consulte instruções para uso
	Cuidado, consulte documentos que acompanham
	Riscos Biológicos
	Temperatura limite
	CE marca
	CE marca de qualidade médica
	Fabricante

HISTÓRICO DE REVISÃO

Revisão	Data	Descrição da Revisão
20	19/03/2019	Adiciona esclarecimentos à seção de resultados. Move a tabela na seção de resultados para a seção de características de desempenho específicas
01	08/04/2019	Melhoria no sistema de Controle de Documentos Internos. Nenhuma alteração no conteúdo do documento.
02	Atual	Atualizada a IU no item de Limitações, incluindo a declaração: "Devido à complexidade das definições alélicas HLA, um especialista ou técnico certificado em HLA deverá revisar e interpretar os dados, definindo a tipagem HLA final. Este teste não deve ser usado como base exclusiva (única) para realizar uma decisão clínica." Atualizado as informações de contato e endereço para refletir a mudança no local fabricação legal. Inclusão do representante brasileiro autorizado.



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