Immucor Transplant Diagnostics, Inc.
550 West Avenue, Stamford, Connecticut 06902, E.U.A.
Tel.: +1 (203) 328-9500 ou (888) 329-0255 (número gratuito), Fax: +1(203) 328-9599
WWW.IMMUCOR.COM

Documentação e Traduções referentes ao Produto estão disponíveis em: www.Immucor.com

FOLHETO INFORMATIVO DO PRODUTO

KITS DE TIPAGEM LIFECODES HLA-Alelo Nulo para utilização com Luminex®

Para utilização em diagnóstico in vitro

ÍNDICE

Definição dos Símbolos 1
Reagentes por Número de Catálogo 2
Utilização Prevista 2
Resumo e Explicação 2
Princípios do Procedimento 2
Reagentes 2
A. Identificação 2
B. Avisos e precauções 2
C. Instruções de armazenamento 3
D. Purificação ou tratamento para utilização 3
E. Indicações de instabilidade 3
Requisitos do Instrumento 3
Colheita e Preparação da Amostra 3
Procedimento 3
A. Materiais fornecidos 3
B. Materiais, reagentes e equipamento necessários mas não fornecidos 3
Instruções de Utilização 3
A. Purificação do ADN genómico 3
B. Amplificação 4
C. Hibridização 4
D. Análise a amostra com o Instrumento Luminex 5
Resultados 5
Controlo de Qualidade 6
Limitação do Procedimento 6
Detecção de Avarias 6
Valores Previstos 6
Características Específicas de Funcionamento 7
Referências 7
Licença Limitada 7
Marcas Comerciais Usadas 7
Anexo A 8
Electroforese em gel 8
Desempenho do gel 8

DEFINIÇÃO DOS SÍMBOLOS (Rótulos do produto e documentos suplementares)

Número do lote	LOT	Número do catálogo	REF	Limitações de temperatura		Limite máximo de temperatura	
Data de validade		Conservar ao abrigo da luz		Suficiente para testes N	Σ	Não congelar	
Atenção – Consultar Instruções de Utilização		Ver Instruções de Utilização		Fabricante		Representante na Europa	REP EC

REAGENTES POR NÚMERO DE CATÁLOGO

LC-N Kit de Tipagem LIFECODES HLA-Alelo Nulo para utilização com Luminex Produto n.º 629100-50

Reagente		Número do produto	Volume de enchimento	Armazenamento	Σ 50
MX-N1	Mistura Padrão LIFECODES Alelo Nulo Classe 1	629001	870 µL	2-8 ºC	Suficiente para 50 testes
MX-N2	Mistura Padrão LIFECODES Alelo Nulo Classe 2	629002	870 µL	2-8 ºC	
BM-N	Mistura de sonda LIFECODES Alelo Nulo ‡	629003	810 µLx 2	**Conservar ao abrigo da luz a** 2-8 ºC	CE 0088
DS	Solução de diluição	628515	19,7 mL	18-30 ºC	

‡As Misturas de sonda são sensíveis à luz: evitar o mais possível a exposição à luz.
ATENÇÃO: não utilizar os componentes após a sua data de validade ter expirado.

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Tipagem do ADN de Alelos Classe I e Classe II em conjunto com Kits de Tipagem LIFECODES HLA SSO.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A tipagem do ADN com base no HLA utilizando ADN amplificado por PCR é um procedimento laboratorial comum. A amplificação do ADN por PCR é utilizada como um meio de melhorar uma região ADN seleccionada. Para a tipagem HLA, é utilizado um teste posterior para determinação das propriedades do ADN amplificado. Têm sido utilizados na tipagem HLA diversos tipos de testes, como o SSP (1), SSOP directo (2), RFLP (3) e SSOP e técnicas "dot blot" reversos (4). Tal como os métodos SSOP e "dot blot" reverso, os kits de Tipagem LIFECODES HLA-SSO utilizam oligonucleótidos específicos para sequência (SSOs) para identificar que alelos HLA estão presentes numa amostra amplificada por PCR. É o conjunto de SSOs empregues, não as metodologias, que determina a capacidade de distinguir entre os vários alelos presentes na amplificação por PCR. Enquanto os métodos "dot blot" e SSOP reversos empregam marcadores enzimáticos e substratos colorimétricos que requerem desenvolvimento posterior, o teste LIFECODES é um sistema homogéneo multiplex. Isto é, todos os SSOs são analisados simultaneamente e o teste é realizado na totalidade num único reactor através da incorporação de um único reagente.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O procedimento de Tipagem LIFECODES HLA-SSO é baseado na hibridização do produto monofilamentar PCR para sondas SSO. A amplificação de ADN por PCR utiliza, normalmente, quantidades equimolares de primer forward e reverse para gerar um produto de ADN bifilamentar. Contudo, se a quantidade de um primer for excessiva em relação ao outro, a reacção irá gerar algum produto de ADN monofilamentar para além do produto bifilamentar. Durante os ciclos iniciais da fase de amplificação LIFECODES, é gerado ADN bifilamentar. Após o primer limitante se ter dissipado, o primer restante utiliza o produto bifilamentar como uma matriz para gerar ADN monofilamentar. Este método gera produtos bifilamentares e monofilamentares que após desnaturação irão ambos participar na reacção de hibridização.

Cada uma das diferentes sondas pode ser homóloga a uma sequência dentro do ADN amplificado que é única para um alelo ou grupo de alelos. Por outras palavras, estas sondas são concebidas de forma a que cada sonda hibridize preferencialmente com uma região complementar que pode ou não estar presente no ADN amplificado. Além disso, o ADN amplificado é também hibridizado com uma ou mais sondas Consensus homólogas a sequências presentes em todos os alelos de um locus. A tipagem SSO pode ser afectada pelo tipo de material biológico, método de purificação, quantidade e integridade do ADN genómico. Por essa razão, o sinal obtido para a(s) sonda(s) Consensus pode servir como um indicador do sucesso dos procedimentos de amplificação e hibridização. De igual forma, o sinal obtido com a sonda Consensus pode ser usado para normalizar o sinal das sondas específicas do alelo e corrigir as variações da quantidade de produto amplificado na reacção de hibridização. A análise dos resultados gerados a partir da tipagem SSO pode ser utilizada para determinação da presença ou ausência de sequências específicas de ADN em ADN amplificado e para identificar os alelos possíveis na amostra.

Para o procedimento de Tipagem LIFECODES HLA-SSO, as Microesferas Luminex concebidas para utilização com o Instrumento Luminex têm sondas anexadas. Podem ser misturadas e analisadas Microesferas Luminex até ao número máximo de 100 populações diferentes através do Instrumento Luminex uma vez que cada população de microesferas pode ser distinguida pela sua assinatura ou cor de fluorescência única. Uma sonda SSO diferente pode estar ligada a cada microesfera de cor. Por esse motivo, uma mistura de várias sondas pode ser distinta uma da outra em virtude da sua associação com microesferas de cores específicas. O Instrumento Luminex consegue também quantificar as quantidades relativas de produto de PCR marcado que hibridiza com cada Microesfera Luminex. Por conseguinte, o sinal relativo obtido com as sondas SSO no ensaio LIFECODES, bem como com outros métodos SSOP, pode ser utilizado para atribuição das sondas que tenham reactividade positiva ou negativa com a amostra de ADN amplificada (consultar a secção Resultados). O que, por sua vez, fornece a informação necessária para determinar o fenótipo HLA da amostra.

HLA-C, resolvendo a ambiguidade alélica entre A*24:02/24:09N, B*51:01/ 51:11N, e C*04:01/04:09N. O Nulo 2 é utilizado como teste complementar para aumentar a resolução do teste LIFECODES HLA-DRB3,4,5, resolvendo a ambiguidade alélica entre DRB4* 01:03/ DRB4* 01:03:01:02N, e DRB5*01:02/DRB5*01:08N.

A fusão da informação do teste Nulo 1 ou 2 com os resultados do Kit de Tipagem LIFECODES SSO correspondente específicos do locus com o objectivo de gerar uma tipagem sugerida de uma amostra pode ser feita através de uma análise manual ou de uma análise por software. Para a análise manual, o resultado dos testes Nulo 1 ou 2 identifica a presença ou ausência de alelos nulos específicos. O resultado dos kits de tipagem LIFECODES SSO de locus específico correspondentes pode conter ambiguidades envolvendo estes alelos nulos (p. ex., A*24:02/24:09N, B*51:01/ 51:11N, C*04:01/04:09N, DRB4* 01:03/ DRB4* 01:03:01:02N, ou DRB5*01:02/DRB5*01:08N). Se o alelo nulo for identificado com o produto Nulo, todas as combinações de alelos que não incluam o alelo nulo podem ser eliminadas dos resultados obtidos com o kit de tipagem LIFECODES SSO de locus específico correspondente. Se o alelo nulo estiver ausente com base no resultado do produto Nulo, todas as combinações de alelos que incluam o alelo Nulo podem ser eliminadas dos resultados obtidos com o kit de tipagem LIFECODES SSO de locus específico correspondente. No folheto informativo do produto e no software, este processo de combinação dos resultados dos dois produtos é referido como fusão dos resultados.

REAGENTES

A. Identificação

Consultar a listagem completa dos números do catálogo nos quadros na secção Reagentes por Número de Catálogo.

B. Avisos e precauções

1. Para utilização de diagnóstico in vitro
2. Devem ser designadas pipetas separadas para manipulações Pré-PCR, assim como para manipulações Pós-PCR.

3. Risco biológico: todas as amostras biológicas e de sangue devem ser tratadas como potencialmente infecciosas. **Durante o manuseamento, seguir as Precauções gerais.**
4. A solução de diluição, as misturas de sonda, a Polimerase Taq e a estreptavidina PE contêm compostos perigosos. Evitar o contacto com a pele e os olhos e deitar fora os materiais após utilização de acordo com regulamentação local. Consultar a informação nas folhas de dados relativa à segurança do material.

C. Instruções de armazenamento

1. Seguir as indicações sobre as temperaturas adequadas para o armazenamento que constam no rótulo da embalagem do componente do kit.
2. As misturas a sonda e estreptavidina PE são sensíveis à luz. **CONSERVAR AO ABRIGO DA LUZ; NÃO CONGELAR.**
3. Não utilizar os componentes após a data de validade ter expirado.

D. Purificação ou tratamento necessário para utilização

Consultar "Colheita e preparação da amostra".

E. Indicações de instabilidade

1. Caso tenha ocorrido precipitação dos sais durante o transporte ou armazenamento, dissolver novamente na totalidade, antes de utilizar, agitando em vórtice à temperatura ambiente (18 a 30 °C).
2. Não utilizar Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina que tenha sido congelada durante o transporte ou armazenamento.

REQUISITOS DO INSTRUMENTO

1. Instrumento Luminex e XY PLATFORM (Número do produto 888300, 888310).
2. Ciclador Térmico equipado com uma tampa aquecida, tempos de activação ajustáveis, um intervalo térmico mínimo de 2 °C a 100 °C e uma precisão mínima de +/- 0,5 °C. As condições para os cicladores térmicos poderão ter de ser alteradas de forma a optimizar os perfis**.** Para obter um perfil térmico contactar o Serviço Técnico, através do número (203) 328-9500 ou (888) 329-0255.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A. O ADN humano pode ser purificado a partir de Sangue total, *Buffy coats* e Esfregaços bucais utilizando um método validado que cumpra os critérios adiante indicados. O ADN extraído de sangue preservado em EDTA e em ACD (Ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose) foi testado, tendo demonstrado resultar neste ensaio.
B. O ADN extraído de sangue preservado em heparina não pode ser utilizado neste ensaio. Não foram testados outros conservantes.
C. O ADN isolado deve estar em 10 mM TRIS, pH 8,0-9,0, ou em água livre de nuclease. Caso esteja presente um agente quelatante como EDTA, a concentração final do agente quelatante não deve exceder 0,5 mM.
D. A presença de álcool, detergentes ou sais pode afectar de forma adversa a amplificação de ADN.
E. A concentração final de ADN deverá ser 10 – 200 ng/µl.
F. As medições de absorvância da amostra de ADN a 260 e 280 nm deverão apresentar um rácio de 1,65 para 2,0.
G. O ADN pode ser utilizado imediatamente após o isolamento ou guardado à temperatura de –20 ºC durante um ano. A congelação e descongelação repetida deve ser evitada uma vez que pode resultar na degradação do ADN.

PROCEDIMENTO

A. Materiais fornecidos (Para informações mais detalhadas, consultar quadros na secção Reagentes por Número de Catálogo

- Mistura padrão adequada (MX)
- Mistura/misturas da sonda adequada (BM)
- Solução de diluição (DS)
- Quadro(s) dos limiares, quadros dos resultados obtidos pela sonda (no sítio Web)

B. Materiais, reagentes e equipamento *necessários* mas não fornecidos (conforme listagem ou equivalente)

- Estreptavidina (SA-PE) conjugada com ficoeritrina (PE), 1mg/ml (Lifecodes N.º cat. 628511)
- Estojo de fluido Luminex (1x Lifecodes N.º cat. 628005)
- Polimerase Taq Recombinante (para kits comprados sem Taq)
- Misturador Vortex
- Água livre de nuclease (Lifecodes N.º cat. 757003; 20 ml)
- Tubos e tampas para PCR (AB Gene® Faixa térmica de 0,2 ml, N.º AB0451/G)
- Placas de 96 poços do ciclador térmico (PCR) (Costar® N.º 6509)
- Película Microseal™ (Bio-Rad, Inc. N.º MSA-5001) ou fita adesiva (Costar® N.º 6524)
- Ciclador térmico (consultar a secção “Requisitos do Instrumento”, página 3)
- Aparelho de ultrasons (Fisher Scientific, N.° FS15 ou FS20)
- Microcentrifugadora
- Ponteiras do filtro de camadas
- Kits de calibragem Luminex (Kit de Calibragem Luminex 100/200, Kit de Verificação de Resultados Luminex 100/200, N.º de catálogo LIFECODES 628018 e 628019, respectivamente)
- Pipetadores, pipetadores multicanais e ponteiras (1-20 µl, 20-200 µl, 1000 µl)
- Software de folha de cálculo para visualizar os ficheiros com o valor separado por vírgula (csv)
- Bloco térmico (Fisher Scientific Standard Heatblock, N.º 13259-030)
- 70% de isopropanol ou 20% de lexívia

INSTRUÇÕES PARA UTILIZAÇÃO

NOTAS:

- As misturas da sonda e a estreptavidina PE são sensíveis à luz: **conservar ao abrigo da luz e não congelar.**
- Aquecer os grânulos a uma temperatura entre os 55 e os 60 ºC durante, pelo menos, 5 a 10 minutos para dissolver completamente os componentes na mistura da sonda.
- Submeter a ultrasons durante pouco tempo (~15 seg.), agitando a mistura em vórtice durante cerca de 15 segundos, de forma a suspender completamente os grânulos.
- Usar do máximo cuidado no processo de formação de alíquotas, utilizando pipetas calibradas. Caso contrário, poderá resultar em perda de reagente e no insucesso da amostra.
- Todas as temperaturas devem ser respeitadas com exactidão. Flutuações tão pequenas como +/- 0,5 °C podem afectar os resultados.

- Na fase de hibridização, as amostras não devem permanecer no estado diluído a 56 ºC durante mais de 5 minutos (consultar a secção "Resultados"). Recomenda-se o ensaio das amostras amplificadas com a maior brevidade possível. Caso as amostras não possam ser processadas no instrumento Luminex no mesmo dia, ***o produto amplificado pode ser guardado até ao máximo de 3 dias entre os 2 e os 8 ºC antes de ser utilizado. Se pretender um armazenamento mais prolongado, armazenar a -20 ºC, durante uma semana no máximo, até ser possível realizar o ensaio. O produto amplificado pode ser congelado e descongelado apenas uma vez. A congelação e descongelação repetida resultará na degradação das amostras amplificadas e fornecerá resultados incorrectos se as mesmas forem utilizadas para ensaio.***

A. Purificação do ADN genómico,

utilizando o método escolhido; a concentração final deve ser 10 – 200 ng/µl. Ajustar, se necessário, com água livre de nuclease. Manter todas as amostras com concentrações semelhantes.

B. Amplificação de ADN (PCR)

1. Deixar que a mistura padrão (MX) aqueça à temperatura ambiente (18-30 °C).
2. Agitar levemente os reagentes em vórtice durante, aproximadamente, 10 segundos. Isto fará com que os sais fiquem dissolvidos. Mexer um pouco (5-10 segundos) na microcentrifugadora, para que o conteúdo assente no fundo do tubo.
3. Utilizando o **quadro 1** abaixo, preparar os componentes para a amplificação para n+1 reacções, usando a quantidade indicada para cada componente por reacção (excepto para ADN). Adicionando água livre de nuclease, fazer com que o volume final atinja 50 µl por reacção. Agitar levemente em vórtice, mexer um pouco o fundo e colocar no gelo.
4. Pipetar a quantidade adequada de ADN Genómico **(100-300 ng)** nos tubos de PCR.
5. Distribuir as alíquotas da mistura de amplificação nos tubos de PCR que contêm o ADN genómico. (O volume total da mistura padrão e ADN genómico deve ser igual a 50 µl para cada reacção de amostra.)
6. Vedar bem os tubos para evitar a evaporação durante o processo de PCR.
7. Colocar as amostras no ciclador térmico e executar o programa, consultar o **quadro 2**.

Quadro 1. Componentes de reacção para amplificação

Componente	Quantidade por reacção de amostra PCR
Mistura padrão LIFECODES	15 µl
ADN genómico **10-200 ng/µl**	**Total de ~200 ng**
Polimerase Taq	0,5 µl (2,5 U)
Água livre de nuclease	Até ao volume final de 50 µl

Nota: para se certificar da amplificação da amostra, consultar a secção Electroforese em gel (Anexo A).

Quadro 2. Condições do ciclador térmico para amplificação

95 ºC durante 5 min. Número de ciclos: 1
95 ºC durante 30 seg. 60 ºC durante 45 seg. 72 ºC durante 45 seg. Número de ciclos: 8
95 ºC durante 30 seg. 63 ºC durante 45 seg. 72 ºC durante 45 seg. Número de ciclos: 32
72 ºC durante 15 min. Número de ciclos: 1

C. Hibridização

- **Certificar-se de que os componentes do tampão de diluição para hibridização da mistura de sonda LIFECODES estão dissolvidos e que os grânulos estão completamente em suspensão.**
- **Ligar o instrumento Luminex e a plataforma XY, dando um tempo de aquecimento de 30 minutos.**

1. Aquecer a mistura da sonda a 55-60 ºC num bloco térmico durante, pelo menos, 5 a 10 minutos para dissolver completamente os componentes na mistura da sonda.
2. Submeter a ultrasons durante pouco tempo (~15 seg), agitando em seguida a mistura em vórtice durante cerca de 15 segundos, para suspender completamente os grânulos.
3. Distribuir alíquotas de 5 µl de produto de PCR de loculus específicos numa placa de 96 poços do ciclador térmico (Costar® N.º 6509).
4. Distribuir alíquotas de 15 µl de mistura de sonda em cada poço. Aquando da distribuição de alíquotas em mais de 10 poços, agitar levemente a mistura de sonda em vórtice depois de cada conjunto de dez. Vedar a placa com Película Microseal®.
5. Hibridizar as amostras nas seguintes condições de incubação:

Quadro 3. Condições do ciclador térmico para hibridização

97 ºC durante 5 minutos 47 ºC durante 30 minutos 56 ºC durante 10 minutos 56 ºC MANTER (HOLD)

6. Enquanto as amostras hibridizam, preparar uma mistura 1:200 de estreptavidina PE / Solução de Diluição. Combinar 170 µl de solução de diluição (DS) e 0,85 µl de 1mg/ml estreptavidina PE (SA-PE) por amostra. *Recomenda-se efectuar a mistura da solução de diluição em quantidade suficiente para n+1 amostras tendo em conta as perdas que ocorrem ao fazer a pipetagem.* ***(Consultar o quadro 4.)***
7. *Manter a mistura da solução de diluição/estreptavidina PE no escuro, à temperatura ambiente; a estreptavidina PE é sensível à luz! A solução de diluição pode ser aquecida a 45 ºC durante 5 minutos e agitada em vórtice após* a sua chegada para assegurar que todos os componentes ficam dissolvidos. **A solução de diluição deve estar à temperatura ambiente (18-30 °C) antes de se efectuar a mistura. Preparar antes da utilização e eliminar qualquer porção que reste.**

Quadro 4. Volumes de preparação da solução de diluição

N.º de amostras	Solução de diluição (DS)	Estreptavidina PE (SA-PE)
1	170 µl	0,85 µl
5	850 µl	4,25 µl
10	1700 µl	8,5 µl
20	3400 µl	17 µl
50	8500 µl	42,5 µl

Nota: NÃO CANCELAR O PROGRAMA DE HIBRIDIZAÇÃO ANTES DE RETIRAR O TABULEIRO DO CICLADOR TÉRMICO!

8. Ao atingir os 56 ºC manter (Hold), enquanto o tabuleiro está no ciclador térmico, diluir cada amostra com 170 µl da mistura da solução de diluição preparada com estreptavidina PE. **É fundamental que todas as amostras sejam diluídas no período de 5 minutos (após o passo HOLD a 56 ºC de 10 minutos).**
9. Retirar o tabuleiro das amostras do ciclador térmico e colocá-lo no instrumento Luminex**.**

D. Análise da amostra utilizando o instrumento Luminex*

Para obter os melhores resultados, submeter de imediato as amostras a ensaio usando o instrumento Luminex.

1. Ligar o instrumento Luminex entre 30 minutos e 4 horas antes de proceder ao ensaio das amostras**.**
2. Antes de analisar as amostras no instrumento Luminex**,** criar um Batch Run (Execução de lote) com o qual as amostras serão analisadas.
   a) Seleccionar ***Create a new batch*** (Criar um novo lote) a partir do menu File (Ficheiro).
      - Por exemplo, no caso de se pretender analisar Nulo Classe I, adicionar Lote para Nulo Classe I
      - O Modelo de Lote (Batch Template) é fornecido no sítio Web, sendo-lhe atribuído, neste caso, o nome de Nulo1 xxxxxx (nº. de lote).
      - Ter em atenção que as versões dos modelos são específicas aos números de lote e correspondem aos números de lote das misturas de sonda.
      - Seguir as instruções que surgem passo a passo no ecrã para a criação de lotes.
      - **Ao atribuir um nome ao lote, não incluir vírgulas no mesmo, uma vez que a informação que se segue a uma vírgula perder-se-á após exportação dos dados.**
      - Para obter mais instruções sobre a forma de criar lotes simples e múltiplos, consultar o Manual do utilizador do Luminex.
   b) Clicar sobre o símbolo Eject (Ejectar) para ejectar o suporte da placa. Colocar a placa do ciclador térmico de 96 poços contendo as amostras no bloco térmico XYP existente no suporte da placa.
   c) Clicar o símbolo Retract (Recolher). As amostras estão agora prontas a ser analisadas. Deverá ser efectuado um passo primário antes de dar início à execução.
   d) Após as amostras terem sido processadas através do instrumento, deverá ser efectuada uma acção de sanitização com 70% de Isopropanol ou 20% de lexívia de uso doméstico, seguida de duas acções de lavagem. Neste momento, o instrumento poderá ser desligado, se não for utilizado durante o resto do dia.
3. Após um lote ter sido completado, os dados são exportados como um ficheiro com o valor separado por vírgula (csv). Estes ficheiros são denominados 'OUTPUT.CSV' e guarados numa pasta cujo Batch Name (Nome do lote) é incluído no Luminex IS. Estes dados ficam então disponíveis para se efectuar as classificações de tipagem conforme se descreve a seguir.

*Consultar o Manual do Utilizador do Luminex IS para conhecer o funcionamento do instrumento, incluindo os procedimentos de início de funcionamento, calibração, manutenção e encerramento diários.

RESULTADOS

A tipagem de amostras pode ser efectuada da seguinte forma:

Os ficheiros CSV gerados podem ser abertos e os dados processados com programas comuns de folha de cálculo como, por exemplo, o Microsoft Excel, Lotus 123, Corel Quattro Pro ou software semelhante. A análise é constituída pelos seguintes passos:

1) Certificar-se de que o Number of Events (Número de eventos) de cada SSO em cada amostra é, pelo menos, 60. Esta informação é encontrada na secção ***DataType: Count*** (Tipo de dados: contagem) no ficheiro CSV.
2) Determinar que os valores das sondas Consensus para cada amostra estão acima da respectiva Intensidade Média de Fluorescência ou MFI mínima. Os limiares mínimos são específicos do conjunto e podem ser encontrados no Quadro dos limiares.

Atenção:

- *Para se obter resultados fiáveis, é necessário dispor de dados suficientes recolhidos pelo instrumento Luminex.*
- *Recolha, pelo menos, 60 ocorrências para cada SSO.*

3) Subtrair o valor do *Background Control* (Controlo de fundo) de cada sonda dos valores da amostra que produzem o conjunto de dados de fundo corrigido. Os valores de controlo de fundo encontram-se no Quadro dos limiares e são específicos do conjunto. Os valores de fundo são valores MFI (Intensidade Média de Fluorescência) pada cara grânulo para compensação de ruído de fundo devido à variação de grânulos.
4) Para cada amostra, dividir os dados de fundo corrigidos de cada sonda pelo valor de fundo corrigido da sonda Consensus correspondente produzindo o conjunto de dados normalizado.

$$\frac{\text{MFI (Sonda)} - \text{MFI (Controlo em branco para sonda)}}{\text{MFI (Consensus)} - \text{MFI (Controlo em branco para Consensus)}}$$

5) Para cada sonda, registar o valor normalizado na folha de cálculo do Quadro dos limiares.
6) Uma vez que tenham sido classificados todos os valores, o padrão de resultados obtidos pela sonda (isto é, a combinação de todos os positivos e negativos atribuídos a uma dada amostra) pode ser comparado com o quadro de resultados obtidos pelas sondas (LC1024) disponibilizado no sítio Web.

Atenção:

- *Existe um Quadro dos limiares separado para cada loculus.*
- ***Estes quadros dos limiares são específicos do conjunto; certifique-se de que o número do conjunto nos quadros dos limiares e o número do conjunto de um kit de tipagem são coincidentes.***

- *Se um valor normalizado de uma sonda específico for superior ao limiar máximo de uma classificação negativa e inferior ao valor mínimo de uma classificação positiva, a amostra deve ser considerada como indeterminada para esta sonda. A amostra deve ser tipada, assumindo inicialmente que o valor é negativo e, em seguida, assumindo que é positivo.*
- ***Consultar a secção VALORES PREVISTOS** para mais informação sobre os valores limiares.*

CONTROLO DE QUALIDADE

Recomenda-se a execução de um controlo positivo e de um controlo negativo com cada teste, por exemplo, um branco com água e uma amostra previamente tipada, respectivamente. As sondas de oligonucleótido da sequência-específica (SSO) consensuais, indicadas no Quadro dos limiares, hibridizam com os respectivos alelos específicos do locus. Os valores obtidos com os SSOs consensuais dos controlos positivos devem exceder o valor limite para os SSO, conforme especificado na Folha de Trabalho do Quadro dos Limiares

A(s) Mistura(s) de sonda LIFECODES contém/contêm uma ou mais sondas SSO identificadas nas folhas de trabalho dos kits de tipagem. Estas sondas consensuais hibridizam com todos os alelos e actuam como controlos internos para verificar a amplificação e para confirmar a ocorrência de hibridizações. Se o valor mínimo não for obtido para estes SSO, a amostra poderá não produzir a tipagem correcta e o teste da amostra deve ser repetido.

O ensaio deve ser executado conforme recomendado na folha de dados, devendo igualmente ser executado com quaisquer outros procedimentos de controlo de qualidade que estejam em conformidade com os requisitos locais, estaduais, federais e/ou das agências de acreditação.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

As condições da PCR e as condições do ensaio descritas exigem condições controladas com precisão. Os desvios destes parâmetros podem conduzir à falha do produto.

Todos os instrumentos devem ser calibrados em conformidade com as recomendações do fabricante e deverão funcionar dentro dos parâmetros recomendados pelo fabricante.

1) Os grânulos devem ser pré-aquecidos e postos em boa suspensão antes da utilização. Este procedimento assegura que os componentes do tampão de hibridização ficam dissolvidos.
2) Incubações a 47 ºC e a 56 ºC exigem um elevado grau de precisão (+/- 0,5 ºC). Deve-se utilizar um ciclador térmico. A temperatura dentro dos poços da placa de 96 poços do ciclador térmico deve ser verificada utilizando um termo-eléctrico (por exemplo, Modelo VPT-0300 da Bio-Rad ou equivalente). A temperatura dentro dos poços e entre os poços não deve variar mais do que +/- 0,5 ºC.
3) O período à temperatura de 56 ºC é muito importante e não deve exceder um total de 15 minutos. Isto inclui a incubação de 10 minutos e não mais de 5 minutos para diluir todas as amostras com a mistura da solução de diluição/estreptavidina PE.
4) **Uma vez diluída, a análise da amostra tem de estar concluída no prazo de 1 hora (proteger da luz).**
5) Não misturar componentes de outros kits e conjuntos.

Devido à natureza complexa da tipagem HLA, a interpretação dos dados e as classificações de tipagem devem ser verificadas por pessoal qualificado.

DETECÇÃO DE AVARIAS

PROBLEMA	CAUSA POSSÍVEL		SOLUÇÃO
Baixa contagem de grânulos	Má suspensão da mistura da sonda		Pré-aquecer, submeter a ultrasons e agitar em vórtice a mistura da sonda, e repetir o ensaio.
	O instrumento não está a funcionar em boas condições	Descalibrado	Calibrar o instrumento. *(Consultar o Manual do Utilizador do Luminex IS.)*
		A conduta de passagem da amostra está bloqueada	Remover e submeter a agulha a ultrasons. Executar fluxo reverso. Contactar a Immucor Transplant Diagnostics, Inc. caso o problema persista (+32/ 3.385.47.91).
Falha do limiar CON	A amostra não foi amplificada ou foi insuficientemente amplificada*	ADN baixo	Verificar a concentração e a pureza do ADN.
		Os sais das concentrações de mistura padrão não estão dissolvidos	Aquecer a mistura padrão a 37 ºC durante 5 minutos, agitar em vórtice ligeiramente e mexer um pouco o fundo.
		Polimerase Taq insuficiente	Utilizar apenas Taq recombinante. Experimentar o Lifecodes n.º 167075.
	As condições de amplificação não estão dentro dos parâmetros específicos		Executar o perfil térmico no ciclador térmico para verificar se os parâmetros estão dentro dos parâmetros especificados.
	Intensidade Média de Fluorescência (MFI) baixa		Aquecer a solução de diluição a 45 ºC durante 5 minutos antes da utilização e agitar em vórtice. Guardar à temperatura ambiente.
			Substituir a Estreptavidina PE.
Falhas múltiplas de SSO ou amostra não consegue fornecer um resultado de tipagem HLA	Amplificação específica do alelo	As condições de amplificação não estão dentro dos parâmetros específicos	Executar o perfil térmico no ciclador térmico para verificar se os parâmetros estão dentro dos parâmetros especificados.
	Amostra de ADN contaminada		Voltar a isolar o ADN da amostra de sangue.
	ADN parcialmente degradado		
	Evaporação durante a fase de hibridização		Caso não se esteja a utilizar a totalidade da placa, deixar uma fila vazia de cada lado das amostras que vão ser ensaiadas, de forma a permitir que a placa fique bem vedada.

*** A amplificação por PCR pode ser verificada através de electroforese em gel (consultar o Anexo A).**

VALORES PREVISTOS

Cada Locus tem uma sonda CON e duas sondas SSO. Se uma amostra contiver um dos locus a ser testado, a sonda de consenso e pelo menos uma das sondas SSO para esse locus devem ser positivas. Normalmente, os valores das sondas podem ser processados como positivos e negativos. Em alguns casos raros, um valor pode situar-se entre os valores de corte positivos e negativos, sendo consequentemente considerado como indeterminado. Se uma amostra contiver valores indeterminados para uma sonda SSO específica, a amostra deve ser tipada com a sonda, em primeiro lugar, como negativa e, em seguida, como positiva. Caso duas sondas SSO para um locus sejam indeterminadas, a amostra não pode ser tipada e deve ser novamente testada.

- Conforme mencionado na secção ***Limitações do procedimento***, é muito importante seguir o protocolo com precisão. Quaisquer desvios podem resultar em erro da tipagem da amostra.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMENTO

Quando são usados kits de tipagem LIFECODES HLA SSO Alelo Nulo de acordo com o procedimento descrito no folheto informativo do produto, o tipo HLA de Classe I e Classe II das amostras de ADN pode ser determinado. O teste HLA – Alelo Nulo Classe 1 (Nulo1) mostra uma concordância de 100% (97,4% limite inferior do intervalo de confiança de 95%) para o locus A, uma concordância de 100% (97,4% limite inferior do intervalo de confiança de 95%) para o locus B, e uma concordância de 100% (97,4% limite inferior do intervalo de confiança de 95%) para o locus C em 139 amostras avaliadas em comparação com os resultados obtidos com sequenciação bidireccional. O teste HLA – Alelo Nulo Classe 2 (Nulo2) mostra uma concordância de 97,1% (92,7% limite inferior do intervalo de confiança de 95%) para o locus DRB 4 e uma concordância de 98,5% (94,8% limite inferior do intervalo de confiança de 95%) para o locus DRB 5 em 137 amostras avaliadas em comparação com os resultados obtidos com sequenciação bidireccional.

REFERÊNCIAS

1. Olerup, O., et al. (1992) Tissue Antigens 39:225
2. Saiki, RK., et al. (1986) Nature 324: 163
3. Maeda, M., et al. (1989) Tissue Antigens 34: 290
4. Bugawan, TL., et al. (1990) Immunogenetics 32: 231

LICENÇA LIMITADA

Este produto não é fornecido com polimerase Taq, nem inclui qualquer licença, no âmbito das patentes estrangeiras propriedade de F. Hoffmann-La Roche Ltd. e Roche Molecular Systems, Inc., para a prática do processo de Reacção em Cadeia da Polimerase ("PCR") descrito nas referidas patentes**.** Para obter informações adicionais sobre a necessidade de aquisição de licenças no seu país, contactar a F. Hoffmann-La Roche Ltd. ou a Roche Molecular Systems, Inc. A aquisição deste produto inclui uma licença limitada não transferível, sob a patente 5.981.180 nos E.U.A. ou respectivas patentes equivalentes estrangeiras propriedade da Luminex Corporation, para efectuar análise multiplexada de amostras clínicas para tipagem de HLA.

Fabricante: Immucor Transplant Diagnostics, Inc., 550 West Avenue, Stamford, Connecticut 06902; E.U.A.
Tel.: +1 (203) 328-9500 or (888) 329-0255 (em E.U.A. e no Canadá), Fax: +1(203) 328-9599

Representante autorizado: Emergo Europe, Molenstraat 15, 2513 BH, Haia, Países Baixos
Tel.: +(31) (0) 70 345 8570; Fax: +(31) (0) 70 346 7299

Assistência técnica na Europa: Telefone**:** +32/3 385 4791

Última revisão e publicação deste documento: Rev. 3, 2014-02-19

MARCAS COMERCIAIS UTILIZADAS

AB Gene®	AB Gene House	IDNA® Agarose	Lonza Group, Ltd.
Costar®	Corning Incorporated	GelStar®	Lonza Group, Ltd.
Microseal™	Bio-Rad Laboratories, Inc.	LIFECODES®	Immucor Inc.
Luminex®	Luminex Corporation		

Anexo A

Electroforese em gel

As reacções PCR executadas nos kits de tipagem LIFECODES HLA-SSO são concebidas para produzir produtos bifilamentares e monofilamentares, que são os produtos predominantes que hibridizam com os SSO. Para garantia de qualidade ou para diagnosticar a existência de problemas com uma experiência, poderá ser necessário efectuar a electroforese em gel para examinar a reacção PCR à presença de ADN amplificado.

Materials necessários (os referidos ou equivalentes)

- Agarose de grau para Ebectroforese (Lonza Group, Ltd. IDNA® Agarose N.º 50170)
- Fonte de alimentação/aparelho de electroforese
- Tampão do gel 1x (40xTAE, Promega N.º V4281)
- Mancha de gel com ácido nucléico GelStar® (Lonza Group, Ltd. N.º 50535)
- Transilluminator UV (ChromatoVUE, UVP Inc. modelo TM36)
- Sistema de imagiologia fotográfica

A migração relativa do produto mofilamentar depende da concentração do gel e do sistema tampão utilizados. As migrações aproximadas para cada amplificação são referidas em baixo para amostras processadas em gel de Agarose a 2% em tampão 1X TAE (tampão tris acetato de electroforese).

Condições para electroforese

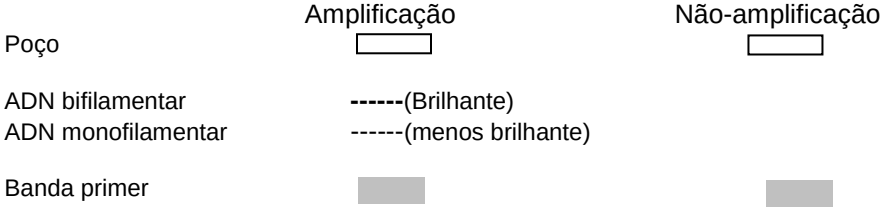
1. Remover a mancha de ácido nucléico GelStar® (Lonza Group, Ltd. N.º 50535) do congelador para descongelar. Manter no escuro.
2. O gel usado para este procedimento deve estar a 2%, isto é, para uma base de 200 ml de gel utilizar 4 gramas de agarose com 200 ml 1X TAE (Diluir de 40X TAE). Adicionar 10 µl da mancha de ácido nucélico GelStar® à agarose fundida. Ao deitar o gel certificar que deixa espaço suficiente para o ADN percorrer uma distância significativa (2,5 a 5 cm) **UTILIZAR COM PRECAUÇÃO: o GelStar® é um carcinogénio potencial.**

NOTA: é possível processar geles com 20 µl de 10 mg/ml de brometo de etídio em vez da mancha de ácido nucélico GelStar®. A intensidade da banda do produto será menor em geles que contenham brometo de etídio do que em geles que contenham GelStar®. **UTILIZAR COM PRECAUÇÃO: o brometo de etídio é um conhecido carcinogénio.**

3. Manter o gel no escuro e deixar solidificar.
4. Carregar uma mistura de 2,5 µl de cada produto PCR e 2,5 µl 2 vezes carregando tampão com corante visível por amostra, por amplificação. Deixar o gel percorrer no escuro a, aproximadamente, 160 volts durante 45 minutos ou até que a amostra tenha percorrido um precurso suficiente que permita ver bandas separadas do produto monofilamentar e bifilamentar (a banda azul de bromofenol ou outro marcador visível migra 2,5 a 5 cm a partir dos poços).
5. Fotografar usando transiluminator UV acompanhado de um filtro fotográfico amarelo GelStar® (Cambrex N.º 50536).

ATENÇÃO: utilizar equipamento protector quando manusear a mancha de ácido nucléico GelStar® ou o brometo de etílio e quando fotografar o gel usando o transiluminador UV.

6. Análise do gel.

	Nulo Classe 1	**Nulo Classe 2**
Bifilamentar(es) (bp)	~210, ~280	~180, ~280
Monofilamentar (bp)	~150,~180	~140,~180

Funcionamento do gel