

FAMÍLIA DE KITS LABTYPE

**Testes de tipagem HLA Classe I - Locus A, B, C, e
Classe II Locus DR e DQ**

Instruções de Uso

APRESENTAÇÃO E COMPOSIÇÃO DA FAMÍLIA

Código	Descrição
RSSO1E47	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I – Exon 4-7 Suplementar - 100 testes
RSO1E47T	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I – Exon 4-7 Suplementar - 20 testes
RSSO1B	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I - Locus B - 100 testes
RSO1BT	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I - Locus B - 20 testes
RSSOH1B	Kit Tipagem HLA Alta Resolução por SSO para Classe I - Locus B - 100 testes
RSOH1BT	Kit Tipagem HLA Alta Resolução por SSO para Classe I - Locus B - 20 testes
RSSO1A	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I - Locus A - 100 testes
RSO1AT	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I - Locus A - 20 testes
RSSOH1A	Kit Tipagem HLA Alta Resolução por SSO para Classe I - Locus A - 100 testes
RSOH1AT	Kit Tipagem HLA Alta Resolução por SSO para Classe I - Locus A - 20 testes
RSSOH2B1	Kit Tipagem HLA Alta Resolução por SSO para Classe II - Locus DRB1 - 100 testes
RSOH2B1T	Kit Tipagem HLA Alta Resolução por SSO para Classe II - Locus DRB1 - 20 testes

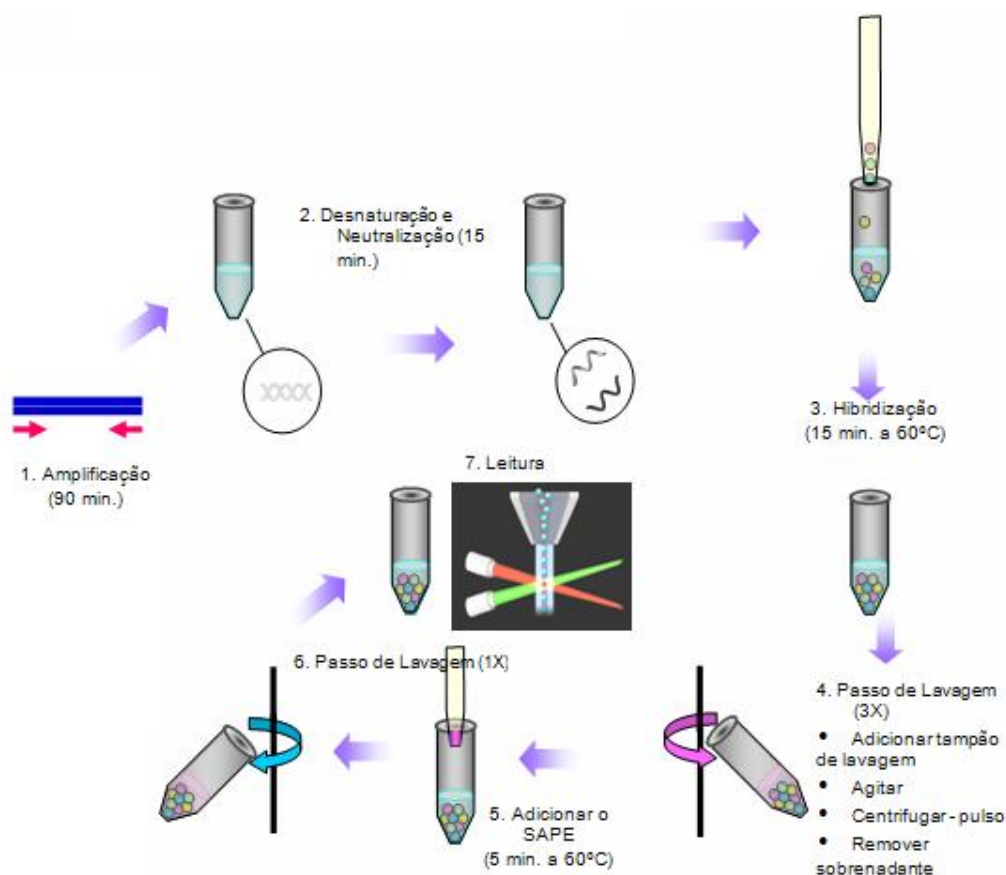
RSSO2Q	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe II - Locus DQA/DQB - 100 testes
RSO2QT	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe II - Locus DQA/DQB - 20 testes
RSSO1S1	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I - Locus B7 - 100 testes
RSO1S1T	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I - Locus B7 - 20 testes
RSSOH1C	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I - Locus C - 100 testes
RSOH1CT	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I - Locus C - 20 testes
RSSOMICA	Kit Tipagem HLA por SSO para MICA - Locus MICA - 40 testes
RSSO2345	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe II - Locus DRB2345 - 100 testes
RSO2345T	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe II - Locus DRB2345 - 20 testes
RSSO1C	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I - Locus C - 100 testes
RSO1CT	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I - Locus C - 20 testes
RSSO1S4	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I e II - Locus BW4 - 100 testes
Código	Descrição
RSO1S4T	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe I e II - Locus BW4 - 20 testes
RSSO2B1	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe II - Locus DRB1 - 100 testes
RSO2B1T	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe II - Locus DRB1 - 20 testes
RSSO2P	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe II - Locus DPA1/DPB1 - 100 testes
RSO2PT	Kit Tipagem HLA por SSO para Classe II - Locus DPA1/DPB1 - 20 testes

USO PRETENDIDO

Tipagem de DNA para alelos HLA de classe I e classe II, utilização *in vitro*.

O sistema de tipagem de DNA **LabType™ SSO** fornece sondas de oligonucleotídeos de sequência específica, imobilizadas em microesferas para identificação de alelos HLA em amostras de DNA genômico, amplificadas através de PCR e posterior hibridação. A análise é realizada em citômetro de fluxo, utilizando o analisador Luminex.

PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO



Resumo e explicação

Os antígenos HLA são heterodímeros polimórficos, codificados por genes localizados no braço curto do cromossomo 6 os quais regulam a resposta imune a patógenos e distingue "próprio" de "não-próprio" na imunologia de transplantes.

Testes de histocompatibilidade permitem a seleção de receptores para doadores de órgãos com um grau de combinação preciso, melhorando o resultado clínico no transplante de órgão sólidos e medula. Os métodos de tipagem baseados na biologia molecular têm sido refinados por testes práticos na montagem do laboratório clínico.

O kit **LabType SSO** utiliza sondas de oligonucleotídeos de sequência específica (SSO) ligados à microesferas codificadas fluorescentemente para identificar alelos HLA na amostra de DNA. A introdução de uma etapa para amplificar o DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido por

hibridação e detecção em um tubo único, torna esse método adequado tanto para teste de pequena quanto de grande escala.

Princípio

O **LabType** aplica a tecnologia Luminex ao método de tipagem por DNA - SSO reverso. Antes de mais nada, o DNA alvo é amplificado usando um primer grupo-específico. O produto da PCR é biotilado (marcado com biotina), o qual permite ser detectado usando Estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina (SAPE).

O produto PCR é desnaturado e permitido nova hibridação com sondas complementares ao DNA alvo a derivados à microesferas codificadas fluorescentemente. Um analisador de fluxo - Analisador Luminex -, identifica a intensidade de fluorescência de PE (ficoeritrina) em cada microesfera. O software de análise, que é fornecido com o kit, auxilia na determinação de genotipagem da amostra de DNA.

COMPONENTES FORNECIDOS

Os componentes do kit estão descritos na seção **APRESENTAÇÃO E COMPOSIÇÃO DA FAMÍLIA**.

Quando dizemos que um kit é para determinado locus, de modo genérico, ele estará representando todos os alelos já encontrados até o momento da fabricação de determinado lote. Cada alelo descoberto gera um novo lote de kit.

OBS.: Os volumes fornecidos são ligeiramente maiores que o montante requerido para teste, para prevenir perdas indesejadas durante o processo de pipetagem.

A mistura de microesferas consiste de um conjunto de microesferas marcadas por fluorescência que transportam em sua superfície sondas únicas de oligonucleotídeos de sequência-específica para alelos HLA. Cada mistura de microesferas inclui um controle positivo e negativo para subtração de sinais de

fundo não específicos e normalização de dados originais para ajustar as possíveis variações, em quantidade de amostra e eficiência de reação.

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

Para cada lote, verifique a *worksheet* fornecida para os alelos HLA específicos, que podem ser identificados por cada sonda usando os procedimentos descritos abaixo. Para lotes específicos de sítios de sondas, referir-se ao documento Informação de Sonda da Bead (Bead Probe Information).

MATERIAIS E NÃO FORNECIDOS

Instrumentos

- Analisador Luminex
- Plataforma Luminex™ XY (acessório opcional para leitura automatizada de 96 amostras no citômetro de fluxo Analisador Luminex, da empresa Luminex Corporation)
- Centrífuga
- Rotor para tubo de microcentrifugação de 1,5 mL (14000 a 18000g)
- Rotor horizontal para microplaca de 96 poços (900 a 1000 g)/tubos em tiras
- Agitador Vortex com velocidade ajustável
- Termociclador da Perkin-Elmer (Applied Biosystems) modelo 9700, equipado com tampa aquecida

Outros Materiais

- Água deionizada
- Etanol 70%

- Solução de hipoclorito a 0,5%
 - Sheath Fluid (solução circulante para citômetro de fluxo)
 - Taq polimerase recombinante
 - Tubos descartáveis de 15-50 mL
 - Placa PCR de paredes finas com 96 poços, e suporte para placa PCR para uso em centrífuga para 1000g – ou tubos em tiras
 - Selador de placa (OLI # SSPSEA300) ou tampas para tiras
- Obs.:** placas PCR (25) e seladores para placas (180) suficientes para 2400 amostras podem ser solicitadas à One Lambda (OLI # PCRTRAC)
- Fonte de eletroforese – 150 V de capacidade mínima
 - Sistema de gel da One Lambda (OLI # MGS-108)
 - Transiluminador UV
 - Sistema de fotodocumentação
 - Tampão TBE 1X (Tris-borato 89 mM; EDTA dissódico 2 mM, pH 8.0) com 0,5 µg/mL de brometo de etídio ou tampão TBE 5X com brometo de etídio (OLI # 5XTBE100)
 - Agarose com grau para eletroforese
 - Pressure Pad para PCR (OLI # SSPPAD)
 - Tubo de microcentrifugação de 1,5mL
 - Ponteiras para pipetas
 - Microplaca 250 µL, com 96 poços, sem superfície tratada
 - Papel alumínio
 - Placa PCR de 96 poços ou tubos em tiras, 0,2 mL capacidade do tubo

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE, LIMITES DE TEMPERATURA, UMIDADE OU PROTEÇÃO À LUZ

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

- a. O tampão SAPE não pode ser recongelado e deve ser armazenado em temperatura entre -80°C e $+8^{\circ}\text{C}$. Após descongelado, deve ser armazenado entre $2-8^{\circ}\text{C}$.
- b. Todos os outros tampões têm uma faixa de armazenamento entre -80°C e $+25^{\circ}\text{C}$, e podem ser recongelados.
- c. Uma vez descongeladas, as esferas não devem mais ser recongeladas, devendo ser conservadas entre $2-8^{\circ}\text{C}$ por até 3 meses.
- d. Os conjuntos de Primers e as DMIX são mais estáveis quando congelados entre -80°C e -20°C , podendo sofrer ciclos de congelamento / descongelamento.

Não utilizar gelo seco para o transporte, pois, o CO_2 pode alterar as propriedades da DMIX.

PRECAUÇÕES

- **Aviso:** O brometo de etídio, usado para a coloração do gel (não incluso), é um produto carcinógeno conhecido. Manuseie com cuidados apropriados. Pode ser nocivo se absorvido pela pele. Evite que seja respingado nos olhos e na pele ou na roupa. Mantenha bem fechado. Lave bem as mãos após o manuseio. Lave a área contaminada com água.
- **Aviso:** O tampão de desnaturação contém hidróxido de sódio diluído, que é corrosivo e pode causar queimaduras. No caso de contato, lave olhos ou pele imediatamente com bastante água por, pelo menos, 15 minutos enquanto, simultaneamente, remove roupas e sapatos contaminados.

- **Cuidado:** Mistura de pérolas LabType SSO são sensíveis à luz e precisam ser protegidas da luz.
- **Cuidado:** use a mistura de pérolas LabType SSO dentro de três meses após terem sido descongeladas

Consulte a FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico - MSDS Material Safety Data Sheet) para informações detalhadas.

O tampão de hibridação, o tampão de lavagem, o tampão de diluição do SAPE e as beads (pérolas) são produtos sem indicação a produtos perigosos ou nocivos ao usuário.

CUIDADOS COM A AMOSTRA BIOLÓGICA

A amostra deverá ser tratada como potencialmente infecciosa, uma vez que o DNA extraído é de origem humana, sem nenhum controle de infecção.

PROCESSO DE MEDIÇÃO

Coleta da Amostra e Preparação

DNA poderá ser purificado de leucócitos humanos por qualquer método de preferência do laboratório.

A amostra de DNA, que será usada para PCR, deverá estar suspendida em água estéril ou em 10 mM Tris-HCl, pH 8.0–9.0 à concentração de 20 ng/μL, com razão a A260/A280 de 1,65-1,80.

As amostras não poderão estar ressuspensas em soluções contendo agentes quelantes, tal como EDTA, acima de 0,5 mM em concentração.

As amostras de DNA podem ser usadas imediatamente após a separação ou armazenadas a –20°C (ou abaixo) para períodos extensos de tempo (acima de 1 ano) sem nenhum efeito adverso nos resultados.

As amostras de DNA deverão ser despachadas a 4°C ou abaixo para preservar sua integridade durante o transporte.

Orientações para uso

Cuidado: *Cuidado especial deverá ser tomado no processo de aliquotagem. Falha no cumprimento das etapas descritas abaixo poderão resultar na perda de reagentes.*

Manuseio da Pérola e Armazenagem

1. Utilize o material plástico recomendado (tubos, placas e ponteiras) para evitar perdas de pérolas devido à adesão não específica.
2. Pérolas LabType™ SSO podem se depositar ou se agregar, se deixadas no tubo. As pérolas devem ser eventualmente homogeneizadas antes de serem dispensadas. Agite bem o frasco com as pérolas por pipetagem repetitiva ou por Vortex na posição horizontal por 10 a 30 segundos, ou tanto quanto necessário, para obter uma mistura totalmente homogênea.
3. O frasco com as pérolas LabType™ SSO é envolvido em papel de alumínio. Não remova o frasco dessa embalagem até que esteja pronto para usar seu conteúdo.
4. Pérolas LabType™ SSO contêm corante fluorescente, bem como sondas HLA alelo específicas, ligadas à sua superfície. Para evitar fotobranqueamento das pérolas, proteja-as da luz durante manuseio e armazenamento. Armazene-as a -20°C em seu tubo bem fechado até o momento do uso. Cubra os frascos onde vão as pérolas com papel alumínio durante o ensaio.

Cuidados:

- Uma vez que as pérolas foram descongeladas, armazene-as a 2-5°C e use-as até 3 meses. Não recongele as pérolas.
- Abra os pacotes contendo a mistura de amplificação de primer e D-mix somente na área de pré-PCR. Armazene esses itens em freezer a -20°C somente na área de pré-PCR.

Amplificação (preparação na área de pré-PCR)

1. Configure a máquina PCR com a programação específica para procedimentos com kit LabType™, conforme mostrado na Tabela 2 abaixo. Confirme todos os parâmetros.
2. Ligue o termociclador para que seja iniciado o aquecimento da tampa.
3. Descongele o DNA, os primers de amplificação e as D-mix. Mantenha em gelo até o momento do uso.
4. Ajuste a concentração do DNA genômico para 20 ng/μL usando água estéril.
5. Agite em vortex a D-mix e o Primer de Amplificação, por 15 segundos. Dê um pulso em centrífuga ou aplique "flicagem" para o que estiver na tampa desça.
6. Usando a Tabela 1 abaixo, misture as quantidades indicadas de D-mix e Primers. Agite em Vortex por 15 segundos, e coloque-os em gelo. Para pipetagem precisa de Taq polimerase, é recomendado que você prepare a máster mix para pelo menos 10 reações.
7. Adicione a Taq polimerase imediatamente antes do uso.

Tabela 1: Mistura de Amplificação

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

8. Pipete 2 μL de DNA (a 20 ng/μL) no fundo de um tubo (para um volume final de 20 μL por PCR). Armazene os tubos ou placas parcialmente cobertas para prevenir evaporação e contaminação.
9. Adicione um montante apropriado de Taq polimerase (ex. 0,2μL por 20 μL de reação) para a mistura de amplificação preparada na etapa B.6.
10. Agite em vortex por alguns segundos, e centrifugue.

11. Fracione 18 µL de mistura de amplificação dentro de cada poço contendo o DNA.

Cuidado: para prevenir contaminação cruzada, certifique-se de não tocar o DNA pré-aliquotado no fundo do tubo.

12. Feche com as tampas ou selador. Se estiver usando um selador, certifique-se de que ficou bem vedado sobre cada borda de cada poço. Coloque a borrachinha sobre a placa, antes de fechar a tampa na máquina de PCR. Feche bem a tampa da máquina de PCR.
13. Corra a PCR conforme o programa na máquina para kits LabType™ SSO, mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Programa PCR para LabType™ SSO

Etapa	Temperatura e Tempo	# ciclos
Etapa 1	96°C 03:00	1
Etapa 2	96°C 00:20	5
	60°C 00:20	
	72°C 00:20	
Etapa 3	96°C 00:10	30
	60°C 00:15	
	72°C 00:20	
Etapa 4	72°C 10:00	1
Etapa 5	4°C infinito	1

14. O DNA amplificado está agora pronto para ser testado (após término da PCR) usando o procedimento de hibridação abaixo. Use 2-5 µL do DNA amplificado para análise em gel de eletroforese. Confirmação do produto amplificado (banda) anterior ao ensaio de hibridação assegura geração de ótimos sinais.
15. Armazene a placa a -20°C ou -80°C.

Preparação do Reagente Teste

1. Ligue o Analisador Luminex e a plataforma XY e siga o procedimento de inicialização conforme descrito nesse documento. O Analisador requer pelo menos 30 minutos para aquecimento.
2. Ligue o termociclador e execute um programa de 60°C HOLD (ou equivalente) por, pelo menos, 1,5 horas (ou HOLD infinito). Deixe uma borrachinha preparada para uso ao lado da máquina PCR (esta borrachinha auxilia a tampa da máquina a vedar melhor o selo que está sobre a placa PCR). Certifique-se de esperar até que a tampa do termociclador alcance a temperatura apropriada antes do uso. Use o suporte para placa 96 poços para assegurar a temperatura de incubação adequada.
3. Remova todos os reagentes de suas armazenagens para a temperatura ambiente (exceto o frasco marrom da solução SAPE 100X). Fracione volumes necessários de reagentes dentro de frascos limpos. Utilize as Tabelas 3, 4 e 5 abaixo para referência. Certifique-se de preparar a solução SAPE 1X durante a terceira etapa de lavagem. Remova o frasco de Solução SAPE 100X do armazenamento somente quando necessário, e retorne imediatamente para 2-5°C. Retorne qualquer porção que não esteja em uso de Mistura de Pérolas e o tampão SAPE para 2-5°C. (Não recongele a Mistura de Pérolas depois de ter sido descongelada).

Reagente	Volume/ teste	Método de preparação e sugestões
Mistura de pérolas	4 µL	Em temperatura ambiente, fracione volume apropriado, mais o volume extra*, para o número requerido de testes dentro de um tubo limpo. Proteja da luz. Utilize o conteúdo completo do tubo de Mistura de Pérolas para 96 amostras Agite em Vortex imediatamente antes do uso
Tampão de hibridação	34 µL	Fracione para exatamente o mesmo número de testes conforme usado para Mistura de Pérolas Adicione à mistura pré-aliquotada de Mistura de

		Pérolas para prepara a Mistura de Hibridação. Utilize 3740 µL para 96 amostras Mantenha em temperatura ambiente (20-25°C) até o uso.
--	--	---

Reagente	Volume/ teste	Método de preparação e sugestões
Tampão de lavagem	480 µL	Fracione volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes requerido, e mantenha em temperatura ambiente (20-25°C). Utilize o volume completo de 50 mL para as 96 amostras
Tampão de desnaturação	2,5 µL	Fracione o volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes. Utilize o volume completo de 2,5 em coquinho para as 96 amostras. Mantenha em temperatura ambiente (20-25°C).
Tampão de neutralização	5 µL	Fracione o volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes. Utilize completamente o volume de 2,5mL em um coquinho para 96 amostras. Mantenha a RT (20-25°C).
SAPE Stock (100X)	0,5 µL	Durante a última etapa de centrifugação, prepare a solução SAPE 1X fazendo diluição 1:100 de SAPE Stock com tampão SAPE para o número apropriado de testes, mais o volume extra*. Proteja da luz. Utilize 57,5 µL de SAPE Stock e adicione 5693µL de Tampão SAPE para 96 amostras. Mantenha o frasco de SAPE Stock a 2-5°C
Tampão SAPE	49,5 µL	

***Obs.:** O volume extra requerido depende da técnica de pipetagem e estado de calibração do equipamento. Utilize um volume total de Mistura de Pérolas do tubo

fornecido (suficiente para aproximadamente 110 testes) para 96 testes. Prepare SAPE 1X para 115 testes, e use o volume total de outros reagentes para prevenir escassez. Recomendamos a calibração e teste de todos os aparelhos de pipetagem pela alíquota de água. Para os reagentes fornecidos com volume em excesso, tal como Tampão de Desnaturação e Neutralização, poderá ser usado um coquinho para pipetagem com pipeta múltipla.

Tabela 4: Volumes de Reagentes

Número de testes	Tampão de Desnaturação (µL)	Tampão de Neutralização (µL)	Tampão de Hibridação (µL)	Tampão de Lavagem (µL) para Placa	Mistura de Pérolas (µL)
1	2,5	5	34	480	4
10	25	50	340	4800	40
20	50	100	680	9600	80
50	125	250	1700	24000	200
96	TUDO	TUDO	3740	TUDO	TUDO

Tabela 5: Volumes de SAPE e Tampão SAPE

Número de Testes	Volume de SAPE Stock (µL)	Volume de Tampão SAPE (µL)
1	0,5	49,5
10	5,0	495,0
20	10,0	990,0
50	25,0	2475,0
96	57,5	5693,0

Obs.: os volumes de reagentes nas Tabelas 4 e 5 são para números exatos de testes. O número real de alíquotas difere dependendo da precisão de pipetagem.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Cuidados Necessários Antes de Começar a Preparar

1. Para analisar um pequeno número de amostras (48 ou menos) poderá ser utilizada uma placa de 96 poços, uma placa que tenha sido cortada para o número apropriado de poços, ou tubos PCR em tira de parede fina com volume de 0,2 mL. Certifique-se de usar um suporte para tubos/placa PCR.
2. Agitar as amostras em uma placa de 96 poços envolve fechamento da placa e agitá-la em Vortex em baixa velocidade por alguns segundos. Ajuste a velocidade do Vortex de modo que o líquido no interior do tubo não espirre em demasia. Anote a velocidade ajustada e utilize-a para o método da placa de 96 poços.
3. O fechamento da placa PCR de 96 poços deverá ser bem feito de modo a prevenir contaminação de amostra poço a poço. Sele a placa fechando o selador contra a borda de cada um dos 96 poços. Não reutilize os seladores. Utilize um selador novo em cada etapa que requeira o uso do selador. Uma pipeta de repetição poderá ser usada quando aplicável; entretanto, um pipetador de repetição é menos preciso na dispensação do volume.
4. Recomendamos uma calibração regular e uma checagem de volume manual para cada volume a ser dispensado. Não utilize uma pipeta de repetição para dispensar a mistura de Hibridação.

Desnaturação/Neutralização

- a. Prepare um banho com gelo picado
- b. Coloque a placa de 96 poços ou as tiras de tubos de 0,2 mL em um suporte para placas PCR
- c. Transfira 5 µL de cada amostra de DNA amplificado dentro de um poço limpo. Certifique-se de que a localização da amostra e sua identificação foram anotadas.
- d. Adicione 2,5 µL de Tampão de desnaturação. Misture bem por pipetagem, e incube em temperatura ambiente (20-25°C) por 10 minutos.

- e. Adicione 5µL de tampão de neutralização com uma pipeta e misture bem com a própria pipeta. Observar a mudança da cor para transparente ou amarelo pálido.
- f. Coloque a placa PCR com o produto PCR neutralizado em banho de gelo

Cuidado: Evite a contaminação do produto amplificado com água.

Hibridação

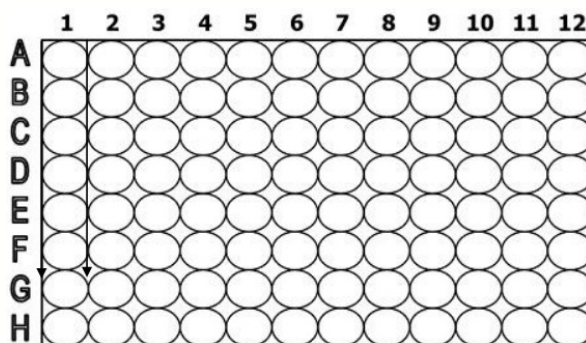
Obs.: certifique-se que o termociclador foi ligado e deixado em execução no programa a 60°C.

- a. Combine volumes apropriados de Mistura de Pérolas e Tampão de Hibridação para preparar a Mistura de Hibridação.
- b. Adicione 38 µL da Mistura de Hibridação a cada poço.
- c. Tampe a placa com selador e agite em Vortex em baixa velocidade.
- d. Remova do suporte da placa e coloque a placa PCR no termociclador pré-aquecido a 60°C
- e. Coloque a borracha seladora no topo da placa (quando estiver usando selador ao invés de tampas). Feche bem a máquina PCR. Incube por 15 minutos.
- f. Coloque a placa em um suporte e remova o selador da placa. Rapidamente adicione 100 µL de Tampão de Lavagem em cada poço. Tampe a placa com o selador. Centrifugue a placa por 5 minutos a 900-1000 x g. Coloque a placa no suporte de placas e remova o tampão de lavagem através de uma leve "flicagem".
- g. Repita a etapa f acima mais duas vezes, perfazendo um total de 3 etapas de lavagens. Lembre-se de preparar solução SAPE1X durante a terceira centrifugação.

Marcação

- a. Coloque a placa no suporte de placas. Adicione 50µL de solução SAPE 1X em cada poço. Coloque o selador na placa e agite em Vortex a baixa velocidade. Coloque a placa em termociclador pré-aquecido (60°C). Coloque

- a borrachinha em cima da placa. Feche bem a máquina. Incube por 5 minutos.
- Remova a placa. Coloque-a no suporte e remova o selador. Rapidamente adicione 100µL de Tampão de Lavagem em cada poço.
 - Tampe a placa com o selador. Centrifugue a placa por 5 minutos a 900-1000g. Coloque-a no suporte e remova o sobrenadante.
 - Adicione 70µL de tampão de lavagem em cada poço, e agite bem por pipetagem. Transfira para a placa de leitura usando uma pipeta multicanal de 8 ou 12 poços. Evite contaminação de amostra-para-amostra usando sempre ponteiros novas, na mudança de fileira.
 - Obs.: o volume final deverá ser de pelo menos 80µL
 - Tampe a placa com selador e papel alumínio. Mantenha a placa no escuro e a 4°C até que seja colocada no Analisador Luminex para a leitura.



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

- Para obter os melhores resultados, leia as amostras tão logo seja possível. O armazenamento prolongado das amostras (superior a 4 horas) pode resultar em perda do sinal. Armazene as placas com selador a 4°C e no escuro se não for possível lê-las imediatamente. Certifique-se de agitar bem as amostras imediatamente antes da leitura.
- Aquisição de dados:** Para detalhes adicionais de como usar o Analisador Luminex consulte o Manual de Operação do equipamento.

Ligando o sistema

1. Conecte o frasco de Sheath Fluid (cheio) e o frasco Waste (vazio) aos seus conectores correspondentes no citômetro.
2. Certifique-se que ambos os frascos estão nivelados com o aparelho.
3. Ligue o citômetro e, então, a plataforma XY (se for o caso), e finalmente o computador.

Iniciando

1. Abra o software de coleta de dados da Luminex
2. Se estiver trabalhando com a plataforma XY, ajuste o default da posição das amostras da plataforma XY sob OPTION, estabeleça a janela XY, de acordo com o manual do Usuário do Analisador Luminex.
3. No menu Startup, pressione o botão WARMUP. Aguarde por 30 minutos até que seja mostrado STANDBY no monitor – no canto superior direito. Se o analisador não tiver sido usado por algumas horas, pode ser necessário passar pelo WARMUP novamente. Para prevenir isso, execute o PRIME uma vez a cada hora que com isso o aparelho não passará pelo WARMUP imediatamente antes da aquisição das amostras.
4. Observe dCalTemp que fica abaixo do STANDBY na tela do computador, e certifique-se que o dCalTemp está entre ± 2.0 . Caso contrário, a calibre o aparelho de acordo com o Manual do Usuário do Analisador Luminex.
5. Pressione o botão PRIME (ato de introduzir água em bomba hidráulica, para deslocar o ar, para que possa efetuar a sucção). Pressione OK para iniciar.
6. Após ter terminado com o PRIMING, ejete o suporte da placa da plataforma pressionando o botão EJECT no menu superior.
7. Adicione álcool 70% dentro de um tubinho (ou reservatório na plataforma XY, para retrain o estágio, pressione RETRACT).
8. Pressione a tecla ALCOHOL FLUSH. Pressione OK para confirmar.
9. Após conclusão do fluxo de álcool, troque o tubo com álcool por um tubo com Sheath Fluid (fluido de circulação).
10. Pressione o botão WASH. Pressione OK para confirmar.

11. Repita a lavagem com o fluido uma vez mais para que sejam feitas duas lavagens consecutivas.

Aquisição de dados

1. Coloque o tubo com a amostra no suporte apropriado, ou ejete o suporte na plataforma para que a placa com as amostras seja colocada adequadamente.
2. Pressione o botão TEMPLATE no menu superior
3. Na opção CHOOSE TEMPLATE, selecione o gabarito (template) desejado. Pressione OK.
4. Na caixa de diálogo onde é solicitado um nome para o New Folder (nova pasta), digite um nome. Pressione OK.
5. Na tela Multiplex Acquisition, pressione SETTINGS no menu superior
6. Ajuste eventos para 100 por pérola (EVENTS 100 Per Bead). Mude SAMPLES para a quantidade de amostras exatas a serem obtidas.
7. Confirmar SAMPLE SIZE a 50 µL. Pressione APPLY para fechar a janela de ajustes.
8. Antes de pressionar o botão START, certifique-se que o tubo com a amostra já se encontra em seu suporte no citômetro. Caso esteja trabalhando com a placa na plataforma, na janela Multiplex Acquisition, clique no botão SINGLE que se encontra abaixo do botão START; isso permite que a aquisição pare após a primeira amostra.
9. Certifique-se que a amostra na primeira fileira esteja indicada (a menos que outra amostra esteja para leitura que não a primeira). Pressione então START, caso esteja trabalhando com a plataforma.
10. Uma aquisição normal deverá durar menos que 1 minuto por amostra.
11. Se os dados estiverem aparentemente normais, certifique-se que a segunda amostra esteja indicada na fileira de identificação das amostras e pressione START. Caso esteja trabalhando com a plataforma XY, clique novamente em SINGLE para que essa função seja desmarcada e pressione START novamente para ser iniciada a aquisição automática de todas as amostras que estão na placa.

12. Depois de ter sido completada a aquisição de todas as amostras, pressione o botão SAVE no menu superior para que seus dados sejam salvos no disco rígido. Caso contrário os dados poderão ser perdidos.

Desligando

1. Prepare um tubo com solução com hipoclorito, ou coloque a solução em um reservatório no interior da plataforma XY.
2. Pressione o botão SANITIZE.
3. Troque o tubo por outro tubo com água destilada. Caso esteja trabalhando com a plataforma, enxágue o reservatório com água e então adicione água destilada em seu interior.
4. Lave o sistema com água por pelo menos 4 vezes.
5. Pressione SOAK.
6. Abra os frascos com o Sheath Fluid e Waste para que a pressão seja liberada, e então desligue o citômetro e a plataforma, se for o caso.
7. Desligue o Computador.

Análises

Siga as instruções de análise do Software LabType™ SSO para importar e analisar os dados.

PROCEDIMENTOS DE CALIBRAÇÃO

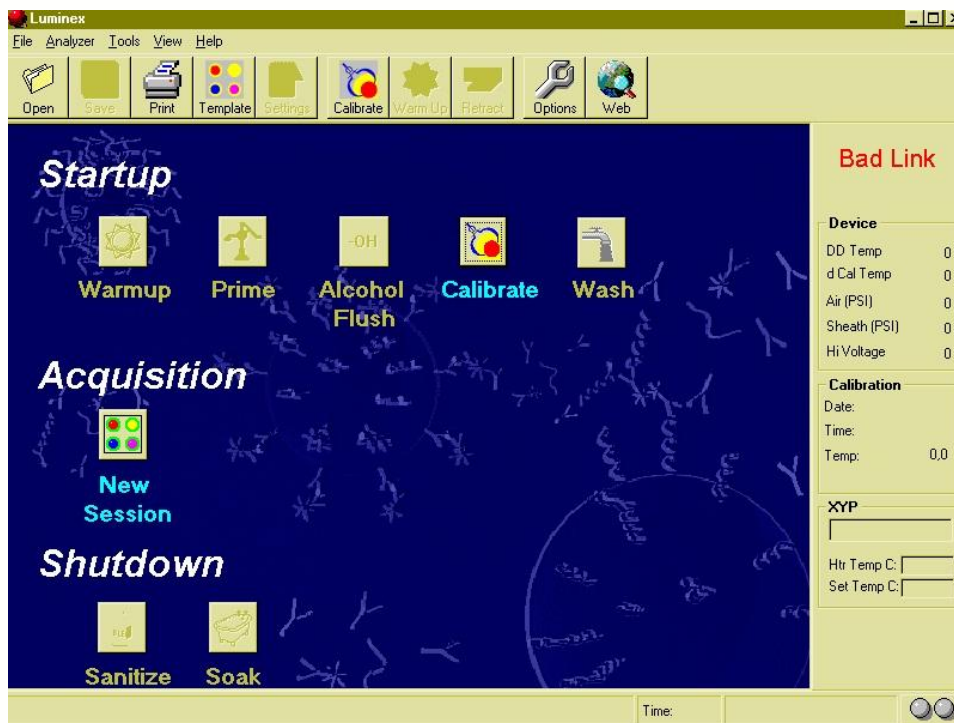
Logo após a instalação ou revisão/manutenção técnica, e durante procedimentos de rotina, a calibração do analisador Luminex deverá ser efetuada. A calibração deverá ser feita diariamente, como parte da rotina de inicialização da máquina e sempre que a temperatura **d Cal Temp** mostrada no monitor do sistema indicar uma mudança de mais de 3 graus Celsius (°C).

Os calibradores são microesferas com propriedades de dispersão de luz conhecida e também com intensidades conhecidas de fluorescência nas faixas dos

comprimentos de onda de Reporter (relator RP1), Classification 1 (classificação CL1), e Classification 2 (classificação CL2).

O processo de calibração utiliza essas microesferas para ajustar classe de voltagem para ótima e classificação consistente de microesfera e leituras de relator (reporter). Ajustes da última calibração realizada se aplicam automaticamente a qualquer nova sessão.

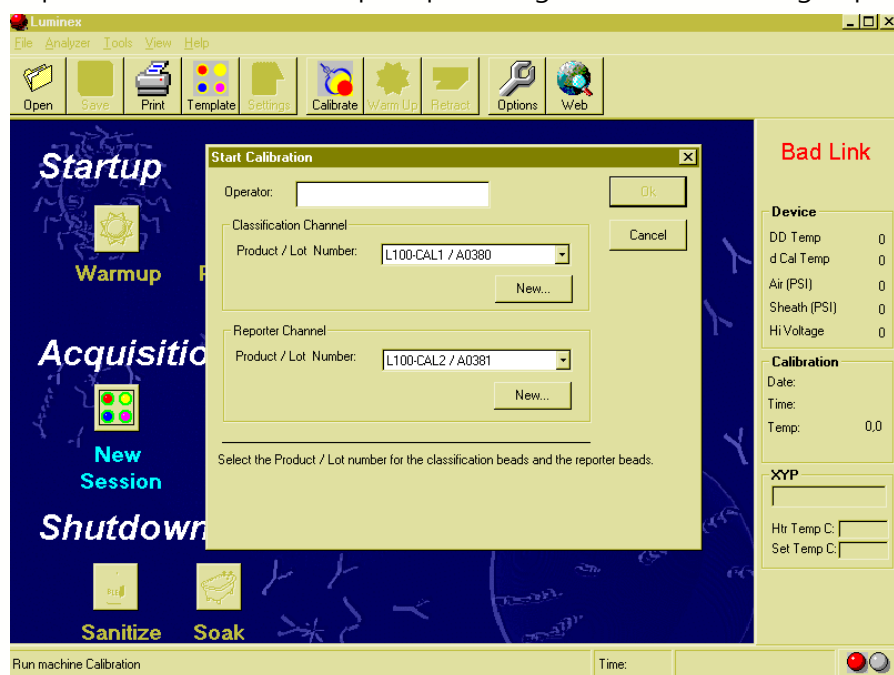
Esta é a aparência da tela principal no computador após ter sido ligado:



→Para calibrar o instrumento:

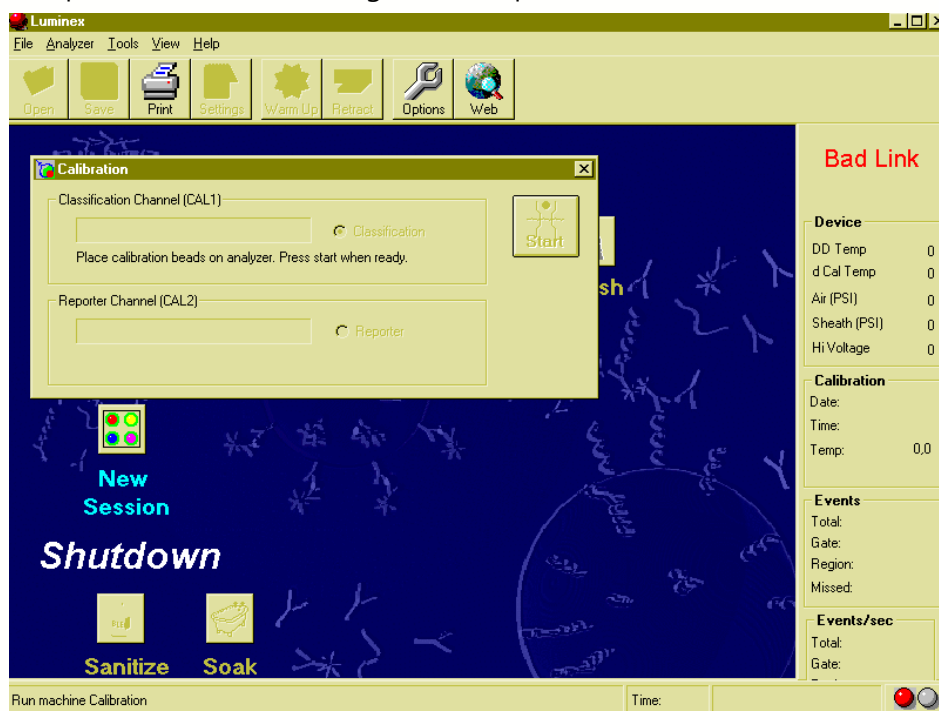
1. Ligue o Analisador Luminex. Clique em **Warmup** na tela principal, e então clique em **OK** na caixa de diálogo que aparecerá. Depois de 30 minutos de aquecimento (warmup), vá para a próxima etapa.
2. Clique em **Prime** na tela principal. Clique **OK** quando você quiser começar o ciclo de prime (onde é deixado entrar o fluido de circulação (sheath fluid) na máquina, para a retirada de bolhas maiores.

3. Remova as microesferas calibradoras (Classification CAL1 e Reporter CAL2) de seu local de estoque, ou seja, das temperaturas de 2-8°C. Agite os frascos com as microesferas em Vortex na posição horizontal.
4. Dispense 5 gotas (aprox. 200 µL) da microesfera de calibração Classification (CAL1) em um tubo identificado de 1,5 mL, e dispense 5 gotas (aprox. 200 µL) da microesfera de calibração Reporter (CAL2) em um outro tubo identificado de 1,5 mL.
5. Envolve os tubos contendo as microesferas com papel alumínio para protegê-las da luz. Permita às microesferas que sua temperatura chegue à temperatura ambiente.
6. Clique em **Alcohol Flush** na tela principal. Utilize 1,2 mL de isopropanol a 70% ou etanol a 70% para o fluxo com álcool. Este fluxo remove qualquer pequena bolha de ar que esteja presente no interior do sistema. Clique **OK** quando estiver pronto para iniciar com o fluxo de álcool.
7. Clique em **Calibrate** na tela principal. A seguinte caixa de diálogo aparecerá:



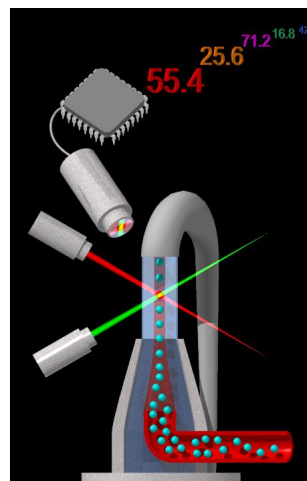
8. Coloque o nome da pessoa que estiver efetuando a calibração no campo solicitado

9. Selecione Product/Lot Number para as microesferas de calibração Classification e na sequência para Repórter.
10. Clique OK. A caixa de diálogo abaixo aparecerá:



11. Coloque o tubo contendo a microesfera de calibração Classification no suporte para amostra localizado na frente do aparelho.
12. Certifique-se de que Classification está selecionado, e então clique Start.

A barra de progresso mostrará o progresso da calibração. A calibração deve levar menos que dois minutos. Se a posição no monitor do sistema mudar para "Sample Empty" antes da calibração se completar, a mensagem "Calibration Failed" aparecerá. Clique **OK** e comece o processo novamente. Quando a calibração acabar para as microesferas de classificação, a mensagem "Calibration Succeeded" aparecerá. Os ajustes e qualquer comentário que for inserido serão incluídos no relatório de calibração.



1. Clique **OK**.
2. Coloque o tubo com as microesferas de calibração reporter (CAL2) no suporte de amostras.
3. Selecione **Reporter** e clique em **Start**.

A barra de progresso mostrará o progresso da calibração. A calibração deverá levar menos que dois minutos. Se a posição no monitor do sistema mudar para "Sample Empty" antes da calibração se completar, a mensagem "Calibration Failed" aparecerá. Clique **OK** e comece o processo novamente. Quando a calibração acabar para as microesferas de classificação, a mensagem "Calibration Succeeded" aparecerá. Os ajustes e qualquer comentário que for inserido será incluído no relatório de calibração.

1. Clique **OK**.

Obs.: as microesferas de calibração são muito concentradas. Cada vez que o instrumento for calibrado, ele deverá ser lavado com 4 ciclos de **WASH** utilizando o fluido de circulação (Sheath Fluid). Notar que entre as microesferas de calibração, deverá ser feita a lavagem por 3 vezes com o fluido de circulação.

CÁLCULOS E OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

Encontra-se abaixo a base de cálculo que o software que acompanha o kit efetua em cima dos resultados adquiridos. Não há necessidade de o técnico de laboratório efetuar qualquer cálculo, uma vez que eles são feitos automaticamente pelos softwares envolvidos no programa.

Base de Cálculo dos Dados

- A. A intensidade fluorescente (FI) gerada pelo software coletor de dados da Luminex, ou equivalente, contém o FI para cada pérola (ou salto da sonda

para a pérola) por amostra. A porcentagem de valor positivo é calculado como:

$$\text{Porcentagem de Valor positivo} = 100 \times \frac{\text{FI (sonda n)} - \text{FI (sonda controle negativo)}}{\text{FI (sonda controle positivo)} - \text{FI (sonda controle negativo)}}$$

A reação positiva é definida pelo percentual de valores positivos para a sonda maior que a sonda com valores de corte pré-ajustados.

A reação negativa é definida como o percentual dos valores positivos menores que o valor de corte.

- B. Compare os percentuais de valores positivos calculados aos valores de corte pré-determinados para cada sonda teste. Designe um atributo positivo às sondas que tenham um percentual positivo acima do corte, e um atributo negativo àquelas que estiverem abaixo do corte. O FI do controle positivo deverá estar dentro de 2000-4000 FI. O FI de cada sonda é normalizado contra o controle positivo FI e é expresso como um percentual do controle positivo FI. O valor pré-ajustado de corte para cada sonda foi estabelecido usando um painel de 100 a 200 amostras de DNA.
- C. Determine o alelo HLA (ou grupo alélico) da amostra combinando o padrão de IDs das pérolas positivas e negativas com a informação na planilha LabType™ SSO.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

O sistema LabType™ SSO combina um processo de amplificação de DNA com HLA locus-específico e um processo de hibridação DNA-DNA. O procedimento, bem como a calibração do equipamento, deve ser estritamente seguido.

A amplificação de DNA é um processo dinâmico que requer condições altamente controladas para obter produtos PCR que são específicos ao segmento alvo do gene HLA. O procedimento fornecido para o processo de amplificação de DNA deve ser estritamente seguido. Em particular, uma vez que a quantidade de amostra de DNA e sua qualidade pode ser significativamente afetada na reação de amplificação, um procedimento padronizado de extração de DNA e uma medição espectrofotométrica da quantidade e qualidade do DNA, seguida pela análise eletroforética em gel, são recomendadas. Em adição, para evitar contaminação do material inicial com produtos PCR, todos os materiais gerados após a amplificação do DNA (materiais pós-PCR, incluindo misturas de reagentes, todos os plásticos descartáveis, e equipamentos, tais como pipetas e materiais de eletroforese e gel) devem ser fisicamente separados dos materiais usados antes da amplificação de DNA (materiais de pré-PCR incluindo todos os plásticos descartáveis, pipetas, amostras de DNA, todos os outros reagentes usados para as reações de amplificação). Testes de esfregaço frequentes para detectar produto PCR durante as etapas de pré-PCR são recomendados.

O ensaio baseado na hibridação DNA-DNA usando LabType™ SSO é um processo altamente sensível à variação de temperatura. A temperatura do bloco de aquecimento, ou equipamento equivalente, usado no ensaio precisa ser frequentemente checado para assegurar reações ótimas. A estrita fidelidade aos tempos de incubações e temperaturas descritas nesse procedimento é crítico para obter resultados ótimos. As microesferas LabType™ SSO são sensíveis à luz e precisam ser protegidos de sua incidência tanto quanto for possível.

Evite congelamento e descongelamento para assegurar máxima validade. Para minimizar a perda de esferas durante o ensaio, siga o protocolo descrito aqui e use somente as ponteiras e tubos indicados aqui. A mistura de microesferas fornecida contém uma quantidade cuidadosamente otimizada de conjuntos de microesferas que transportam sondas com alelos HLA específicos. Qualquer alteração da mistura afetaria significativamente a precisão do ensaio e anularia o resultado.

Todos os instrumentos (ex., termociclador, pipetas, analisador e o bloco de aquecimento) precisam ser calibrados de acordo com as recomendações de seus fabricantes.

Para informação lote-específico, referir-se ao documento de Informação da Sonda da Pérola.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Pérolas que exibem descoloração ou agregação, que não podem ser removidos por agitação em Vortex, deverão ser desconsideradas para uso.

Se houve precipitação de sais na solução das alíquotas de D-mix durante armazenagem ou transporte, redissolva por agitação em Vortex em temperatura ambiente (20-25°C).

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

Uma corrida eletroforética deverá ser realizada antes de começar o processo de hibridação descrito acima, para que seja verificada a total amplificação das amostras que passaram pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Características de desempenho específicas

Em amostras normais e usando ensaio e condições de aquisição de dados que estão dentro das especificações descritas nestas instruções de uso (ex., concentração inicial do DNA genômico de 20 ng/μL e pureza OD260/280 de 1.65 a 1.80, temperatura de incubação de hibridação e condições de lavagem, e o estado de performance do LabScreen™ 100), reações positivas e negativas são determinadas pela comparação da intensidade fluorescente (FI) comparativa da amostra ao seu correspondente valor de corte.

O valor de corte foi experimentalmente determinado por um dado lote do produto LabType™ SSO, e o corte é usado para distinguir entre sinais positivos e negativos, baseados na genotipagem HLA de uma amostra. Os resultados são

esperados para refletir a presença ou ausência de certos alelos HLA, fornecendo uma indicação de tipagem regular.

Em amostras anormais ou sob ensaio e condições de aquisição anormais, os valores pré-determinados de corte precisarão de ajuste para designar a especificidade HLA. Por exemplo, quantidade ou qualidade insuficientes de DNA deve requerer redução dos valores de corte.

Condições de ensaio anormais, tais como temperatura de incubação de hibridação ou temperatura de reagente fora de $60^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ requererá, provavelmente, ajuste dos valores de corte pré-determinados (menor temperatura = maior FI e maiores temperaturas = menor FI).

VALORES DE REFERÊNCIA OBTIDOS EM POPULAÇÕES SADIAS OU VALORES DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, ESTATÍSTICOS, DESEJÁVEIS, TERAPÊUTICOS OU TÓXICOS

Não existe este tipo de dado para a metodologia em questão.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Valores esperados

A. Amplificação da Amostra

1. Espera-se que a mistura de primer HLA locus-específico fornecida produza quantidade adequada de DNA amplificado. A falha na detecção de um produto amplificado pelo brometo de etídio corando gel eletroforético de agarose anula os resultados do teste.
2. Amplificação de DNA é sujeita à contaminação por DNA anteriormente amplificado. A detecção de contaminação pode anular os resultados dos testes (fazendo-se um controle de amplificação usando água ou teste de esfregaço para DNA pré-estabelecido para detecção de produtos DNA amplificados).

B. Analisador Luminex

1. O Analisador Luminex é um citômetro de fluxo avançado que requer manutenção e calibração diária. Consulte o Manual do Usuário do Analisador Luminex para todas as operações de manutenções necessárias. A manutenção diária inclui rotina de procedimentos de inicialização e desligamento. Para melhor desempenho, calibre o instrumento como se isso fizesse parte da rotina de inicialização da máquina todos os dias. Calibre o instrumento sempre que o valor de dCalTemp estiver diferente de $\pm 2^{\circ}\text{C}$.
2. O instrumento deverá passar pelo teste de calibração antes que as amostras LabType™ SSO sejam analisadas.

C. Aquisição de Dados e Análise

Para obter um dado válido, dois parâmetros – intensidade fluorescente e contagem – deverão ser monitorados para cada aquisição de dados. A contagem representa o número total de pérolas que foram analisadas, e a contagem deverá ser superior a 100. Uma redução significativa na contagem sugere perda de pérolas durante a aquisição e ensaio da amostra e pode anular o resultado do teste. A intensidade fluorescente (FI) representa um sinal PE detectado dentro das pérolas contadas. FI varia segundo resultado da reação. O valor de FI esperado para a sonda de controle positivo seria de 1000 a 3600, dependendo do pool de pérolas e lote. A redução significativa no FI para sonda controle positivo sugere quantidade e/ou qualidade de amostra inadequada, fraca eficiência de ensaio, ou falha do instrumento e pode anular os resultados dos testes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

The Luminex 200™ User's Manual, Luminex Corporation, PN 89-00002-00-005 Rev. B.

NG J, HURLEY CK, BAXTER-LOWE LA, et al. Large-scale oligonucleotide typing for HLA-DRB1/3/4 and HLA-DQB1 is highly accurate, specific, and reliable. Tissue Antigens. 1993; 42: 473-479. Rev. 4: June 2002 Page 10 of 11 LABType_PI.doc

BODMER JG, MARSH SGE, ALBERT E, BODMER WF, BONTROP RE, DUPONT B, ERLICH HA, HANSEN JA, MACH B, MAYR WR, PARHAM P, PETERSDORF EW, SASASUKI T, SCHREUDER GMT, STROMINGER JL, SVEJGAARD A, TERASAKI PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. Tissue Antigens, 53, 407-446, 1999. Human Immunology, 60, 361-395, 1999. European Journal of Immunogenetics, 26, 81-116, 1999.

COLINAS RJ, BELLISARIO R et al. Multiplexed genotyping of beta-globin variants from PCR-amplified newborn blood spot DNA by hybridization with allele-specific oligodeoxynucleotides coupled to an array of fluorescent microspheres. Clinical Chemistry 46: 996-998, 2000.

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.

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

Tel.: (41) 2108-5250

Fax: (41) 2108-5252

DDG: 0800-7260504

E-mail: biometrix@biometrix.com.br

Website: www.biometrix.com.br

CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

One Lambda, Inc.

21001 Kittridge Street

Canoga Park – CA – EUA

REGISTRO ANVISA

80298490005

Responsável Técnica

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira

CRQ/PR: 09302336

REVISÕES

Revisão	Descrição da Alteração	Data
00	Elaboração	12/2006
01	Formatação, layout, produtos descontinuados, alteração nas condições de armazenagem e transporte, inclusão das denominações comerciais de cada item da família, inclusão de número de registro em alteração de Responsável Técnica	01/2011
02	Produtos descontinuados pelo fabricante: RSSO2PB1 e RSO2PB1T	09/2011
03	Produto incluso na família: RSSO2P	01/2012
04	Alteração do DDG	09/2012
05	Inclusão do produto: RSO2PT, layout, revisão ortográfica e gramatical, alteração de Responsável Técnica	12/2012