

INSTRUÇÕES DE USO

FAMÍLIA DOS KITS LABTYPE® XR e CWD

Labtype CWD Classe I Locus A	RSOW1AT	KIT Tipificação HLA por SSO CWD para Classe I – Locus A – 20 testes
	RSSOW1A	KIT Tipificação HLA por SSO CWD para Classe I – Locus A – 100 testes
Labtype CWD Classe I Locus B	RSOW1BT	KIT Tipificação HLA por SSO CWD para Classe I – Locus B – 20 testes
	RSSOW1B	KIT Tipificação HLA por SSO CWD para Classe I – Locus B – 100 testes
Labtype CWD Classe II Locus DRB1	RSOW2B1T	KIT Tipificação HLA por SSO CWD para Classe II – Locus DRB1 – 20 testes
	RSSOW2B1	KIT Tipificação HLA por SSO CWD para Classe II – Locus DRB1 – 100 testes
Labtype XR Classe I Locus A	RSOX1AT	KIT Tipificação HLA Alta Resolução por SSO XR para Classe I – Locus A – 20 testes
	RSSOX1A	KIT Tipificação HLA Alta Resolução por SSO XR para Classe I – Locus A – 100 testes
Labtype XR Classe I Locus B	RSOX1BT	KIT Tipificação HLA Alta Resolução por SSO XR para Classe I – Locus B – 20 testes
	RSSOX1B	KIT Tipificação HLA Alta Resolução por SSO XR para Classe I – Locus B – 100 testes
Labtype XR Classe II Locus DRB1	RSOX2B1T	KIT Tipificação HLA Alta Resolução por SSO XR para Classe II – Locus DRB1 – 20 testes
	RSSOX2B1	KIT Tipificação HLA Alta Resolução por SSO XR para Classe II – Locus DRB1 – 100 testes

1. USO PRETENDIDO

Tipagem de DNA para alelos HLA de Classe I e de Classe II.

PRODUTO PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO

2. INTRODUÇÃO

Os Antígenos leucocitários humanos (HLA) eram anteriormente determinados pelo teste de linfocitotoxicidade. Entretanto, com o advento das tecnologias da PCR, técnicas de tipagem baseadas em DNA tornaram-se rotina nos laboratórios. Para a grande maioria das metodologias baseadas em DNA, o processo da PCR é utilizado somente como um passo de amplificação para obter o DNA alvo necessário. Normalmente, o processo de tipagem HLA requer um passo pós-amplificação para discriminar entre os diferentes alelos (ex.: RFLP, SSOP, DOT BLOT reverso).

O kit LABType SSO utiliza sondas de oligonucleotídeos de sequência específica (SSO) ligados à beads codificadas por fluorescência 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 os testes de pequena como para os de grande escala. Ao contrário da escala de reação de linfocitotoxicidade (1=negativo para 8=positivo), os resultados dos testes LABType® podem ser positivos ou negativos, facilitando a interpretação de resultados complexos. Diferenças em apenas um nucleotídeo podem ser diferenciadas

na PCR-SSO, enquanto que grupos de reatividade cruzada (CREGs) tornam-se desafios na tipagem sorológica.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O kit LABType® XR e CWD envolve exons 2-5 para loci A e B e exon 2 para locus DRB1 e também contém probes (sondas) que irão tipar alelos Comuns e Bem Documentados com base na listagem atual de CWD disponível no banco de dados IMGT/HLA. Os produtos de teste de tipagem são usados em conjunto com o equipamento LABScan 3D (Equipamento da Luminex® FLEXMAP 3D®). Os produtos de teste de tipagem aplicam a tecnologia Luminex ao método de tipagem DNA SSO reverso. O equipamento Labscan 3D combina conjuntos de microesferas coradas fluorescentemente para permitir multiplexação em até 500 ensaios singulares dentro de uma única amostra.

Neste ensaio, o DNA alvo é amplificado por PCR 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 depois hibridizado com sondas de DNA complementares aderidos à beads codificadas por fluorescência. O analisador Labscan 3D™ (Luminex FLEXMAP 3D®) identifica a intensidade de fluorescência da PE (ficoeritrina) em cada microesfera. Reações positivas são identificadas por comparação do sinal fluorescente para cada probe teste como um percentual do sinal da probe (sonda) de controle interno positiva a um dado valor de cutoff.

Existe um software de análise separado (HLA Fusion) que pode ser usado para ajudar na determinação da tipagem HLA.

4. COMPONENTES

O sistema de tipagem LABType® XR e CWD fornece sondas de oligonucleotídeos de sequência específica, imobilizadas em beads para identificação de alelos HLA em amostras de DNA genômico, amplificadas através de PCR e com posterior hibridação. A análise é realizada utilizando um analisador de fluxo, Labscan 3D™ . Os componentes do sistema consistem em:

- Mistura de *beads* pré-otimizadas com sondas de oligonucleotídeos de sequência-específica para alelos HLA
- Tampão de hibridização para facilitar a ligação do DNA alvo a sonda específica
- Tampão de lavagem para eliminar resíduos da reação
- Tampão de SAPE para diluir a solução estoque SAPE
- Reagentes para amplificação (mistura pré-otimizada de primers HLA Loco-específico): é essencial o uso do primer e bead kit-específico. Estes reagentes são extremamente específicos aos lotes e não são intercambiáveis entre os kits e lotes.
- D-mix (mistura de tampão de amplificação especialmente formulado).



A mistura de *beads* consiste de um conjunto de *beads* marcadas por fluorescência que possuem aderidas a sua superfície sondas únicas de oligonucleotídeos de sequência-específica para alelos HLA. Cada conjunto de *beads* inclui uma microesfera controle positivo e negativo para subtração de sinais não específicos (*background*) e normalização dos dados originais para ajustar as possíveis variações, em quantidade de amostra e eficiência de reação.

A mistura de *beads* é pré-otimizada para produtos de PCR específicos, obtidos pela amplificação de DNA usando mistura de primer HLA Loco-específico. Essas misturas de primer 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 e o programa da PCR detalhado abaixo.

Para cada lote, verifique a *worksheet* fornecido para os alelos HLA específicos, que podem ser identificados por cada sonda usando os procedimentos descritos abaixo. Para lotes específicos de sítios de sondas, consulte o documento Informações Sonda e Bead (*Bead Probe Information*).

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Todos os produtos da família de tipagem de DNA LabType XR e CWD podem ser seguramente armazenadas congeladas em temperaturas de -80 a -20°C na sua caixa de produto. Evitar manuseio desnecessário. É recomendado manter a embalagem inteira intacta e congelada no recebimento até o momento de uso. Verificar a tabela abaixo para as condições de armazenamento individuais de cada componente.

Código	Informações sobre transporte	Temperatura de armazenamento
Mistura de Beads LABType XR e CWD DNA	Transportados com gelo reciclável	-80°C a -20°C Proteger da luz Depois de descongelado armazenar a 2°C a 8°C por 3 meses
Conjunto de Primers locus específico	Transportados com gelo reciclável	-80°C a -20°C Depois de descongelado armazenar a 2°C a 8°C por 3 meses
Tampão de Desnaturação	Transportados com gelo reciclável	-80°C a 25°C
Tampão de Neutralização	Transportados com gelo reciclável	-80°C a 25°C
Tampão de Hibridização	Transportados com gelo reciclável	-80°C a 25°C
Tampão de Lavagem	Transportados com gelo reciclável	-80°C a 25°C
Tampão para SAPE	Transportados com gelo reciclável	-80°C a -20°C Depois de descongelado armazenar a 2°C a 8°C por 3 meses

<u>Solução D-Mix</u>	Transportados com gelo reciclável	-80°C a -20°C Depois de descongelado armazenar a 2°C a 8°C por 3 meses
----------------------	-----------------------------------	---

Indicações de Instabilidade:

1. Beads que apresentem descoloração ou agregação que não podem ser removidas por agitação em Vortex, deve ser considerada não apropriada para uso.
2. Se sais precipitaram em qualquer um dos reagentes durante transporte ou armazenagem, devem ser redissolvidos por agitação em Vortex em temperatura ambiente (20° a 25°C).
3. Alíquotas de d-mix, depois de descongeladas em temperatura ambiente (20° a 25°C), deve estar na coloração rosa ou lilás (roxo claro). Qualquer alíquota de d-mix sem a coloração específica deve ser considerada inapropriada ao uso.

6. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

6.1 Equipamentos:

- Labscan 3D™ (Luminex FlexMAP 3D): analisador de fluxo
- Centrífuga
 - Rotor para tubos de microcentrifugação de 1,5mL (14.000 NA 18.000 g)
 - Rotor tipo swing com caçapa para microplaca de 96 poços (1000 a 1300 g)
- Agitador tipo Vortex com velocidade ajustável
- Termociclador – Veriti™ 96 poços com compatível com os seguintes parâmetros:
 - Formato de bloco de liga de 0,2mL
 - Característica padrão 0,2mL formato de 96 poços
 - Capacidade de aquecimento da tampa mantendo a 103°C
 - Permitir correr 9600 modos de emulação na rampa de amostra de +0,8°C/seg e -1,6°C/seg
 - Diferencial de temperatura máxima 25°C pelo bloco, 5°C zona a zona
 - Exatidão de zona de temperatura de ±0.25°C (35–99.9°C)
 - Faixa na zona de temperatura de 4.0°C a 99.9°C
 - Uniformidade de temperatura na zona <0.5°C (20 segundos depois de alcançar 95°C).
 - Faixa de volume na zona de PCR 10-80µL.

6.2 Materiais requeridos mas não fornecidos:

- Etanol 70%
- Água deionizada
- Solução de hipoclorito a 0,5%
- Sheath Fluid (OLI Cat.#LXSF20 ou LSXF20X5)
- Taq polimerase recombinante
- Estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina (OLI Cat.# LT-SAPE)
- Tubos descartáveis de 15 a 50 mL
- Placa PCR de paredes finas com 96 poços, e suporte para placa PCR para uso em centrífuga que suporta de 1000 – 1300g

Obs.: A placa de PCR tem que ter ajuste justo com o bloco.

- Selos para placa ou tampas para tiras
- Pressure Pad para PCR (OLI # SSPPAD)
- Banho de gelo ou equivalente
- Microtubos de 1,5mL
- Ponteiros descartáveis
- Microplaca fundo V poliestireno capacidade 250 µL, formato de 96 poços, sem superfície tratada

Obs: Outras especificações usadas devem ser validadas pelo laboratório

6.3 Materiais opcionais, não fornecidos:

- Fonte de eletroforese – capacidade mínima de 150 V
- Sistema de gel da One Lambda (OLI # MGS-108)
- Transiluminador UV - capacidade mínima de 150 V
- 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

7. MATERIAIS FORNECIDOS:

OBS.: os volumes fornecidos são levemente maiores que a quantidade requerida para teste. Isso se faz necessário para qualquer perda inadvertida que possa resultar do processo de pipetagem. Não misture componentes de diferentes lotes de produtos.

Kit para 100 testes	
2,25 mL Tampão de Desnaturação - 1 frasco	4,95 mL Tampão de SAPE - 1 frasco
2,5 mL Tampão de Neutralização - 1 frasco	1,38 mL de Primer Set D-mix - 2 frascos de 690 µl cada
3,4 mL Tampão de Hibridização - 1 frasco	400 µl de Primer Loco-específico - 2 frascos de 690 µl cada
55 mL Tampão de Lavagem – 1 frasco	Bead - 400 µl LABType® SSO primário - 1 frasco/ * 20 µl Suplementar - 1 frasco
Kit para 20 testes	
50 µl Tampão de Desnaturação - 1 frasco	990 µl Tampão de SAPE - 1 frasco
100 µl Tampão de Neutralização - 1 frasco	276 µl de Primer Set D-mix - 1 frasco
680 µl Tampão de Hibridização - 1 frasco	80 µl de Primer Loco-específico – 1 frasco
10 mL Tampão de Lavagem - 1 frasco	Bead - 80 µl LABType® SSO - 1frasco

8. PRECAUÇÕES E AVISOS

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, na pele ou na roupa. Mantenha bem fechado. Lave bem as mãos após o manuseio. Lave a área contaminada com água em abundância.

Aviso: Os tampões de desnaturação e neutralização são corrosivos e podem 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.

Advertência de potencial risco biológico: A amostra deverá ser tratada como potencialmente infectante, uma vez que o DNA extraído é de origem humana, sem nenhum controle de infecção.

Cuidado: Cuidado especial deverá ser tomado no processo de alíquotagem. Falha no cumprimento das etapas descritas no item 8 deste documento, poderão resultar na perda de reagentes.

Cuidado: Mistura de beads LabType SSO são sensíveis à luz e precisam ser protegidas da luz.

Cuidado: use a mistura de beads LabType SSO dentro de três meses após terem sido descongeladas.

Para informações de segurança consultar a FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico) e/ou MSDS (Material Safety Data Sheet) para informações detalhadas.

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

Outros resíduos gerados devem ser manuseados como potencialmente infectantes e descartados, de acordo com as diretrizes e regras relativas a resíduos laboratoriais.

9. AMOSTRAS

- A. O DNA pode ser purificado a partir de quaisquer células humanas por qualquer método validado de preferência, que atenda os critérios de pureza e concentração abaixo. A amostra de DNA a ser utilizada para análise por PCR-SSP deve ser ressuspensa em água estéril ou em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8.0-9.0 a uma concentração ótima de 20 ng/μL com uma pureza na razão A260/280 de 1.65-1.80. Outras especificações usadas devem ser validadas pelo laboratório.
- B. Amostras não devem conter inibidores de polimerase DNA e nem ser ressuspensas em soluções contendo agentes quelantes, tais como EDTA, acima de 0,5 mM de concentração.
- C. As amostras de DNA devem ser utilizadas imediatamente após extração ou então devem ser armazenadas a -20°C ou abaixo durante longos períodos de tempo sem que ocorram efeitos adversos nos resultados.
- D. As amostras de DNA devem ser transportadas a 4°C ou abaixo, a fim de preservar a integridade durante o transporte.

10. PREPARO DOS COMPONENTES

Atenção: cuidado especial deve ser tomado no processo de alíquotagem. Falha nas etapas descritas abaixo pode resultar em perda de reagente.

10.1 Armazenamento e manuseio da Bead.

- a. Use material plástico descartável validado uso no laboratório. Uso de plásticos sem conhecimento podem acarretar na perda de beads devido a adesão não específica.
- b. As beads do LabType XR e CWD podem se depositar e se agregar se deixadas em tubo. As beads devem ser uniformemente distribuídas antes da dispensação. Sempre agite muito bem as beads vigorosamente por pipetagem ou por agitação em Vortex com o tubo na posição horizontal por 10 a 30 segundos, ou o quanto for necessário, para obter mistura homogênea total.
- c. Para os testes com a família de produtos LabType XR e CWD é recomendado seguir os seguintes procedimentos para ajudar a prevenir agregação das beads. Nas etapas de hibridização e marcação do procedimento de protocolo abaixo, remover o máximo de líquidos quanto for possível invertendo a placa sobre um papel toalha e gentilmente batendo a placa sobre esse papel (ainda invertida) para que o excesso de líquido seja removido. Tampar a placa e agitar suavemente a baixa velocidade para liberar os pellets de beads formados. Prosseguir com o protocolo conforme descrito.
- d. A mistura de beads do LabType XR e CWD são embaladas em saco aluminizado. Não remova-as desse saco até o momento de uso.
- e. A mistura de beads do LabType XR e CWD contém corante fluorescente interno, bem como sondas HLA alelo específicas, em sua superfície. Para evitar photo bleaching (descoramento da fluorescência por interferência da luz externa) das beads, proteja as beads da luz durante o uso e armazenamento. Armazene as beads a -80 a -20°C em seu tubo fornecido bem fechado até momento de uso. Cubra as beads com papel alumínio ou equivalente durante o ensaio.

Cuidado:

- ✓ Uma vez que as beads tenham sido descongeladas, armazene-as a 2-8°C e use-as dentro de 3 meses. Não recongele as beads.
- ✓ Abrir os pacotes contendo mistura de primers e d-mix somente na área de pre-amplificação. Armazene estes itens a -80 a -20°C na área de pre-amplificação.

10.2 Amplificação (preparação na área de pré-PCR)

- Configure o termociclador com a programação específico para o kit LABType® SSO, conforme descrito na Tabela abaixo (2). Confirme todos os parâmetros.
- Ligue o termociclador para que seja iniciado o aquecimento da tampa.
- Descongele o DNA, os primers e a D-mix. Mantenha em gelo até o uso.
- Ajuste a concentração do DNA genômico para 20 ng/μL, utilize água estéril.

- Agite em vortex a D-mix e o Primer de Amplificação, por 15 segundos. Dê um pulso em centrífuga ou aplique “flicagem” para que o que estiver na tampa desça.
- Com base na Tabela 1, misture as quantidades indicadas de D-mix e Primers. Agite em vortex por 15 segundos, e coloque-os em gelo.
Obs.: Para pipetagem precisa de Taq polimerase, é recomendado preparar a mix principal para pelo menos 10 reações.
- Adicione a Taq polimerase imediatamente antes do uso.

Tabela 1: Mistura de Amplificação

Nº 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)

- Pipete 2 µL de DNA (a 20 ng/µL) no fundo do poço (volume final de 20 µL por reação de PCR). Armazene os tubos ou placas parcialmente cobertos para prevenir evaporação e contaminação.
- Adicione a quantidade apropriada de Taq polimerase (ex. 0,2 µL [tipicamente a 5U/uL] por 20 µL de reação) a mistura de amplificação preparada na etapa 8.1.
- Agite em vortex por alguns segundos, e dê um pulso em centrífuga (3 a 5s).
- Adicione 18 µL de mistura de amplificação em cada poço contendo DNA.
Cuidado: para prevenir contaminação cruzada, não toque no DNA pré-aliquotado no fundo do poço.
- Feche com tampa ou selo. Se estiver usando um selo, certifique-se de que ficou bem vedado sobre cada borda de cada poço. Coloque a almofada emborrachada sobre a placa, antes de fechar a tampa do termociclador. Feche bem a tampa do termociclador.
- Corra a PCR conforme o programa descrito na tabela 2.
- Para o sistema GeneAmp® 9700, configure “ramp speed” (velocidade da rampa) para o programa 9600. Para Veriti™ ajuste “ramp speed” para o programa 9600.
 - Para outros modelos, consulte o manual do fabricante para ajustar a velocidade da rampa a fim de simular o programa do GeneAmp® 9600. Diferenças significativas na velocidade da rampa podem afetar a eficiência da amplificação e dos resultados finais.

Tabela 2: Programa PCR para LABType® XR e CWD

Etapa	Temperatura e Tempo de Incubação	Nº de 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

- Após o termino da PCR, o DNA amplificado está pronto para seguir o procedimento de acordo com a etapa 12.

OBS.: Recomenda-se o uso de 2-5 µL do DNA amplificado para análise em gel de eletroforese. A confirmação do produto amplificado (banda) garante ótima hibridização.

- Caso o produto amplificado não seja usado de imediato, armazene a placa a -20° a -80°C por até um mês.

10.3 Preparação para o teste

- 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.
- Ligue o termociclador e execute um programa de 60°C HOLD (ou equivalente) por pelo menos 1 hora e 30 min (ou HOLD infinito). Deixe uma almofada emborrachada preparada para uso ao lado da máquina PCR (esta almofada 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.
- Retire todos os reagentes de suas armazenagens e deixa atingir temperatura ambiente (exceto o frasco da solução SAPE 100X). Fracione volumes necessários de reagentes para frascos limpos. Utilize as Tabelas 3, 4 e 5 abaixo como referência. Preparar a solução SAPE 1X durante a terceira etapa de lavagem. Retire o frasco de Solução SAPE 100X do armazenamento somente quando necessário, e retorne imediatamente para armazenamento entre 2 a 8°C. Retorne qualquer alíquota que não esteja em uso de mistura de Beads e o tampão SAPE para armazenamento entre 2 a 8°C.
- Atenção:** Não recongele a Mistura de Beads depois de ter sido descongelada.

Tabela 3: Preparo dos reagentes

Reagente	Volume por teste	Método de preparação e sugestões
Mistura de Beads	4 µL	Em temperatura ambiente, alíquotar o volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes dentro de um tubo limpo.

		Proteja da luz. Utilizar todo o conteúdo do tubo de mistura de beads para 96 amostras. Agite em Vortex imediatamente antes do uso
Tampão de hibridação	34 µL	Aliquotar exatamente para o mesmo número de testes conforme usado para a mistura de beads. Adicionar o tampão de hibridação a mistura pré-aliquotada de beads. Mantenha em temperatura ambiente (20 a 25°C) até o uso.
Tampão de lavagem	480 µL	Aliquotar o volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes requerido, e mantenha em temperatura ambiente (20-25°C). Utilize o volume completo suficiente para as 96 amostras.
Tampão de desnaturação	2,5 µL	Aliquotar o volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes, e mantenha em temperatura ambiente (20 a 25°C). Utilize o volume completo suficiente para as 96 amostras.
Tampão de neutralização	5 µL	Aliquotar o volume apropriado, mais o volume extra*, para o número de testes, e mantenha em temperatura ambiente (20 a 25°C). Utilize completamente o volume de 2,5 mL para 96 amostras.
SAPE Estoque (100X)	0,5 µL	Durante a última etapa de centrifugação, prepare a solução SAPE 1X fazendo diluição 1:100 de SAPE Estoque com tampão SAPE para o número apropriado de reações, mais o volume extra*. Proteja da luz. Preparar uma quantidade suficiente de solução SAPE 1X para 96 amostras (cerca de 110 amostras, dependendo do erro de pipetagem). Mantenha o frasco de SAPE Estoque a 2-8°C

*Obs.: O volume extra requerido depende da técnica de pipetagem e da calibração do equipamento. Utilize o volume total de Mistura de Beads do tubo fornecido (suficiente para aproximadamente 110 testes) para 96 reações. Prepare SAPE 1X para 115 reações, e use o volume total dos outros reagentes para evitar que falte. Recomendamos a calibração de todos os aparelhos de pipetagem e testes com alíquotas de água para verificação. Para os reagentes fornecidos com volume em excesso, tal como Tampão de Desnaturação e Neutralização, poderá ser usado um recipiente para pipetagem com multicanal.

Tabela 4: Volume dos Reagentes

N° testes	Tampão de Desnaturação (µL)	Tampão de Neutralização (µL)	Tampão de Hibridação (µL)	Tampão de Lavagem (µL) para Placa	Mistura de Beads (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	240	480	3264	46080	384

Tabela 5: Volume de SAPE e Tampão SAPE

Número de Testes	Volume de SAPE Estoque 10X (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	48,0	4752,0

Obs.: o volume dos reagentes nas Tabelas 4 e 5 são para o número exato de testes. A quantidade real de alíquotas difere dependendo da precisão da pipetagem. Para um ensaio completo de 96 amostras, recomendamos que utilize toda a mistura de beads, todo o volume de tampão de hibridação, 57,5 µL de SAPE Estoque e 5693 µL de tampão SAPE, que é ligeiramente mais do que a quantidade exata necessária para o teste.

11. EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS UTILIZADAS EM CONJUNTO COM O PRODUTO

11.1 Operando o Sistema Luminex

Ligando o Equipamento

Ligue o equipamento, após o computador e monitor.

Inicialização do Sistema

- O software xPONENT® apresenta uma **rotina de inicialização pré-definida** para preparar o analisador para aquisição de dados. Essa seção descreve o **pré-aquecimento, a calibração semanal e a verificação diária do desempenho do sistema**.
- Aqueça os lasers para preparar o sistema ótico antes da aquisição de amostra. O sistema inicia o pré-aquecimento automaticamente ao ser ligado; no entanto, será necessário utilizar o comando **Warmup** (Pré-Aquecimento) se o sistema estiver inativo por quatro horas ou mais. A falha no procedimento de pré-aquecimento dos lasers afetará os resultados da análise e o desempenho dos sistemas.
- Na barra **System Status** (Status do Sistema), clique no botão Laser se estiver amarelo ou abra a página **Maintenance** (Manutenção) e, em seguida, a guia **Cmds & Routines** (Comandos e Rotinas). Na seção **Commands** (Comandos), clique em **Warmup** (Pré-Aquecer) no canto esquerdo da tela, e clique no botão **Run** (Executar) no canto inferior direito para iniciar o procedimento. O processo de pré-aquecimento leva em torno de 30 minutos para ser completado.
- As esferas calibradoras xMAP são utilizadas para normalizar as configurações do canal repórter, tanto para os canais de classificação quanto para o canal diferenciador de pares. As esferas de verificação xMAP são usadas para verificar a calibração e a integridade ótica do sistema.
- Aquisição de dados: Em seguida descreve-se de um modo geral a aquisição de dados. Para maiores informações de como usar o Analisador Luminex consulte o Manual de Operação do equipamento.

Pagina Home – Criando um protocolo

- Click to Create a new Batch from a new Protocol (Clique para Criar uma nova bateria em um novo protocolo): Cria uma nova bateria de um novo protocolo ao abrir a guia Settings (Configurações) na página Batches (Baterias). Os usuários podem criar protocolos em tempo real quando a bateria for criada e terão, ainda, a opção de salvar o protocolo antes ou depois da execução da bateria. Para outras informações consulte "Criar uma Nova Bateria a partir de um Novo Protocolo".
- Click to Create a new Batch using the highlighted Protocol below (Clique para criar uma nova bateria usando o protocolo selecionado): Cria uma nova bateria usando um protocolo selecionado na lista Installed Protocols (protocolos instalados). Para outras informações sobre a criação de baterias em um protocolo existente consulte "Criar um novo protocolo em um protocolo existente".
- Installed Protocols (Protocolos Instalados): Mostra a lista de protocolos. A lista contém as seguintes informações sobre cada protocolo:
 - Nome (Name)
 - Versão (Version)
 - Fabricante (Manufacturer)
 - Data (Date)

Create a New Multi-Batch (Criar uma nova Multibateria)

- Utilize esse botão para adicionar ou remover baterias pendentes à configuração Multibateria para executar uma Multibateria. Uma Multibateria é composta de uma ou mais baterias separadas, as quais, juntas, cabem em uma placa. Utilize a função Multibateria para economizar placas.
 - NOTA: Não é possível adicionar uma bateria que força várias placas em uma operação Multibateria. Ao criar ou adicionar baterias, certifique-se de que suas baterias cabem em uma placa.
- Multi-Batch Name (Nome da Multibateria) utilize esse campo para criar um nome para as novas Multibaterias que deseja salvar.
- Select Pending Batch (Selecionar Baterias Pendentes) Contém uma lista de todas as baterias pendentes. Essa lista contém nome, protocolo, versão do protocolo, data e status de cada bateria pendente. Selecione a bateria que deseja adicionar à placa. Clique OK. O diagrama de disposição da placa preenche automaticamente os poços da bateria.
- Clique Add (Adicionar) para abrir novamente a caixa e adicionar outras baterias.
- Multi-Batch (Multibateria). Lista as baterias pendentes selecionadas para a Multibateria.
- A lista contém nome e a indicação do poço "Start at" (Iniciar em).



- Plate Layout (Disposição da Placa). Abre a caixa de diálogo Multibatch Report (Relatório Multibateria) que contém:
 - Page (Página). Utilize essas setas para rolar através das páginas do relatório.
 - Zoom. Selecione um relatório da lista para maximizá-lo.
 - Print (Imprimir). Imprime o relatório.
 - Save (Salvar). Salva o relatório.
 - Close (Fechar). Fecha a caixa de diálogo de relatórios.
- A função Multibatch Plate Layout Report (Relatório de Disposição de Placa Multibateria) contém a disposição da placa Multibateria, o número do comando, a Localização da placa, o tipo de comando, a identificação da amostra e a diluição. O relatório contém data e horário.
- New Batch (Nova Bateria). Abre a guia Create New Batch (Criar Nova Bateria). Crie sua nova bateria. Clique Save (Salvar) para voltar para a guia New Multibatch (Nova Multibateria).
- Add (Adicionar). Abre a caixa Select Pending Batch (Selecionar Bateria Pendente). Adicione uma bateria a partir das opções disponíveis, incluindo baterias recém-criadas. A bateria selecionada aparece na disposição da placa. Se as baterias selecionadas não cabem na placa, uma caixa de diálogo de erro aparece, indicando que você precisa editar uma ou mais das baterias selecionadas. A função Multibateria irá configurar automaticamente as baterias lado a lado se houver espaço disponível na placa. Depois de adicionar cada bateria, o software adiciona automaticamente a próxima bateria ao primeiro poço de próxima coluna ou fileira (dependendo da direção da placa).
- Também é possível selecionar primeiro um poço, que coloca a próxima bateria no local escolhido.
- Remove (Remover). Remove uma bateria selecionada na lista Multi-Batch (Multibateria). A bateria ainda ficará na seção Pending Batches (Baterias Pendentes) (Esse botão aparece apenas se você adicionou e marcou uma bateria na lista Multi-Batch [Multibateria]).
- Cancel (Cancelar). Volta para a guia principal Batches (Baterias) sem salvar.
- Save (Salvar). Salva uma Multibateria recém-criada e a adiciona à lista Select Pending
- Batch (Selecionar Bateria Pendente).
 - NOTA: Quando uma bateria é salva em uma Multibateria, não é possível editá-la ou apagá-la, a menos que seja removida da Multibateria.
- Run (Executar). Executa a bateria.

Desligando o Analisador

- Na página Home, clique em Shutdown (Desligar). Abre-se a guia Auto Maint (Manutenção Automática), com a opção System Shutdown (Desligamento do Sistema) marcada.



- Consulte a representação da placa na parte inferior direita da guia Auto Maint (Manutenção Automática). Preencha o poço indicado nessa representação com uma solução de água e 0,5% de água sanitária.
- Adicione água deionizada ao reservatório.
- Clique em Run (Executar).

Logout do Software

- Para fazer logout do xPONENT®, clique no ícone Log Off do canto superior direito da janela do software. A caixa de diálogo Confirm Logout (Confirmar Logout) aparece.
- Clique OK.
 - NOTA: Isso não fecha o software, apenas faz o logout.

Sair/Fechar o Software

- Faça o logout do Software. Aparecerá a página System Log-in (Login do Sistema).
- Clique na guia Exit (Sair) e clique em Yes (Sim).

12. PROTOCOLO

12.1 Precauções Técnicas

1. Para analisar um pequeno número de amostras (48 ou menos) pode 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 devidamente selada e agitá-la em vortex em baixa velocidade por alguns segundos. Ajuste a velocidade do vortex de modo que o líquido dos tubos não espirre em demasia. Anote a velocidade ajustada e utilize-a para o método da placa de 96 poços.
3. O fechamento da placa de PCR deverá ser feita com cuidado para prevenir contaminação das amostras entre os poços. 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 solicite o uso do selador. Uma pipeta automática poderá ser utilizada quando aplicável; entretanto, uma pipeta automática é menos precisa 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 automática para dispensar a mistura de Híbridação.



12.2 Desnaturação/Neutralização

- Prepare um banho com gelo
- Coloque a placa de 96 poços ou as tiras de tubos em um suporte para placas
- Transfira 2,5 µL de Tampão de desnaturação.
- Adicione 5 µL de cada amostra de DNA amplificado para outra placa limpa. Certifique-se de que a localização da amostra e sua identificação foram anotadas. Misture bem por pipetagem, e incube em temperatura ambiente (20 a 25°C) por 10 minutos.
- Adicione 5µL de tampão de neutralização com uma pipeta e misture bem com a própria pipeta. Observar a mudança da cor de rosa para transparente ou amarelo claro.
- Coloque a placa PCR com o produto PCR neutralizado em banho de gelo.
Cuidado: Evite a contaminação do produto amplificado com água.

12.3 Hibridização

Obs.: certifique-se que o termociclador foi ligado e o programa a 60°C esta em execução.

- Combinar volumes apropriados de Mistura de Beads e Tampão de Hibridação para preparar a Mistura de Hibridização.
- Adicionar 38 µL da Mistura de Hibridação a cada poço.
- Tampar a placa com selador e agite em vortex em baixa velocidade.
- Remover do suporte de placa e coloque a placa PCR no termociclador pré-aquecido a 60°C
- Colocar a borracha PCR sobre a placa (quando estiver usando selador ao invés de tampas). Feche bem o termociclador. Incube por 15 minutos.
- Colocar 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 1000-1300 g. Coloque a placa no suporte de placas e remova o tampão de lavagem por “flicagem”.
- Repetir a etapa acima mais duas vezes, perfazendo um total de 3 etapas de lavagens.

Atenção: Lembre-se de preparar a solução SAPE 1X durante a terceira centrifugação.

12.4 Marcação

- Colocar a placa no suporte de placas. Adicione 50µL de solução SAPE 1X em cada poço. Coloque o selador na placa e agite em vortex em baixa velocidade. Coloque a placa em termociclador pré-aquecido (60°C). Coloque a borracha PCR sobre a placa ou tampe os tubos PCR. Feche bem a termociclador. Incubar por 5 minutos.
- Remover a placa. Coloque-a no suporte e remova o selador. Rapidamente adicione 100µL de Tampão de Lavagem em cada poço.
- Tampar a placa com o selador. Centrifugue a placa por 5 minutos a 1000-1300g. Coloque-a no suporte e remova o sobrenadante por “flicagem”.

- Adicionar 70µL de tampão de lavagem em cada poço, e agite gentilmente por pipetagem. Transfira para a placa de leitura usando uma pipeta multicanal de 8 ou 12 canais. Evite contaminação entre amostras fazendo uso de ponteira nova em cada 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 Labscan 3D para a leitura.
- Para obter os melhores resultados, leia as amostras imediatamente. 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.

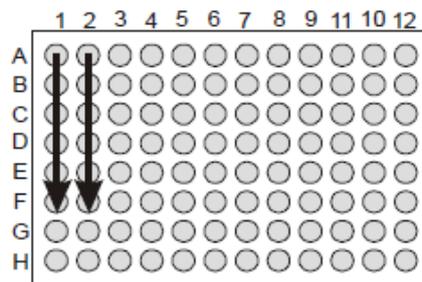


Figura: A plataforma XY lê a amostra conforme o seguinte padrão:
A1 para H1, A2 para H2,... A12 para H12.

12.5 Cálculos e obtenção dos resultados

Encontra-se abaixo a base de cálculo que o software HLA Fusion™ efetua em cima dos dados adquiridos no Luminex®. Não há necessidade de efetuar qualquer cálculo, uma vez que são feitos automaticamente pelo software de análise.

Base de Cálculo dos Dados

A intensidade média de fluorescência (MFI) gerado pelo software xPONENT do Analisador Luminex®, ou equivalente, contém o MFI para cada bead (ou sonda ligada a bead) por amostra. A porcentagem do valor positivo é calculado da seguinte forma:

Cálculo de Positividade:

$$100 \times \left(\frac{\text{MFI (bead n)} - \text{MFI (bead CN)}}{\text{MFI (bead CP)} - \text{MFI (beadCN)}} \right)$$

A reação positiva é definida pelo percentual de valores positivos das sondas com valores acima do cut-off (corte) estabelecido pelo controle de qualidade da One Lambda. A reação negativa é definida como o percentual dos valores positivos inferior ao valor de cut-off. Em condições sob controle de CQ do produto, o MFI para controle negativo é tipicamente 0-100 e pode variar entre lotes e produtos locus-específico. Sinais fora da faixa podem representar controles ineficazes dos parâmetros do ensaio

tais como quantidade de amostra e/ou qualidade da amostra, técnica, calibração do instrumento, e estado de todos os reagentes incluindo DNA amplificado, tampões, SAPE e a mistura de beads.

Compare os percentuais de valores positivos calculados aos valores de cut-off pré-determinados para cada sonda testada. Designe um atributo positivo às sondas que tenham um percentual positivo acima do cut-off, e um atributo negativo àquelas que estiverem abaixo do cut-off. O MFI do controle positivo deverá ser maior que 1000 MFI (Caso o valor de MFI esteja fora desta faixa – ver Valores Esperados), e varia para cada sonda de controle positivo e lote. O MFI de cada sonda é normalizado de acordo com o MFI controle positivo e é expresso como um percentual do MFI controle positivo. Os valores de cut-off de cada sonda foram estabelecidos com base em um painel de 100 a 200 amostras de DNA.

Análise de dados:

Determine o alelo HLA (ou grupo alélico) da amostra combinando o padrão de IDs das beads positivas e negativas com a informação worksheet LABType® XR e CWD, ou com o uso do software HLA Fusion™ versão 4.0 ou maior, com referências no Manual de Usuário do HLA Fusion..

13. DESEMPENHO, INTERFERENTES E LIMITAÇÕES

13.1 Características específicas de desempenho

Em amostras normais e utilizando condições de ensaio e de aquisição de dados que estejam de acordo com as especificações descritas nesta instrução de uso (ex., concentração inicial do DNA genômico de 20 ng/μL e pureza DO260/280 entre 1.65 a 1.80, condições de temperatura de incubação da hibridização e de lavagem, e o estado do desempenho do Labscan3D™), reações positivas e negativas são determinadas por comparação do MFI relativo da amostra ao seu valor de cut-off correspondente. O valor de cut-off foi experimentalmente determinado para cada lote de produto LABType® XR e CWD e o cut-off é utilizado para distinguir entre os sinais positivos e negativos, baseados na genotipagem HLA da amostra. Espera-se que os resultados demonstrem a presença ou ausência de determinado(s) alelo(s) HLA, fornecendo uma indicação clara de tipagem.

A avaliação de desempenho da família de produtos de tipagem de DNA LabType XR e CWD foram testadas em sua habilidade em obter resultados de tipagem corretos usando 90-96 amostras DNA de referência e aprovadas. Os resultados mostraram 100% de concordância na tipagem de referência. A reprodutibilidade do teste LabType XR e CWD foi testado. Baseado nos dados gerados de 90 diferentes sessões, os testes LabType XR e CWD são altamente reprodutíveis como o limite inferior do intervalo de confiança unilateral de 95% para o padrão de reação total sendo excedidos 0.95 entre os técnicos, dias e corridas.

13.2 Limitações do processo

O sistema LABType® XR e CWD combina um processo de amplificação de DNA loco-específico e um processo de hibridização DNA-DNA. O procedimento, bem como a calibração do equipamento, deve ser seguido estritamente.

A amplificação de DNA é um processo dinâmico que requer condições estritamente controladas a fim de obter produtos PCR que são específicos ao gene alvo do HLA. O procedimento fornecido para a amplificação de DNA deve ser estritamente seguido. Especificamente, como a quantidade e a qualidade da amostra de DNA podem afetar significativamente a reação de amplificação, é de extrema importância que haja um procedimento extração de DNA padronizado e uma medição no espectrofotômetro a fim de avaliar a quantidade e qualidade do DNA, também recomendamos a análise eletroforética em gel. Além disso, para evitar a contaminação do material inicial com produtos da 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 em 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).

Recomenda-se a realização de testes de esfregaço na área de Pré-PCR com métodos de detecção validados e que estejam em conformidade com as diretrizes do órgão regulamentador competente.

O método de hibridização utilizado no LABType® XR e CWD é um processo altamente sensível à variação de temperatura. A temperatura do bloco de aquecimento usado no ensaio precisa ser frequentemente verificado (calibrado). Os tempos de incubações e temperaturas devem ser seguidos rigorosamente para garantir a obtenção de resultados ótimos. As beads LABType® XR e CWD são sensíveis à luz e precisam ser protegidos de sua incidência, tanto quanto for possível. Evite congelamento e descongelamento para assegurar um prazo de validade máximo.

A mistura de beads fornecida contém uma quantidade cuidadosamente otimizada de conjuntos de beads com sondas específicas para os alelos HLA. Qualquer alteração da mistura afetaria significativamente a precisão do ensaio e invalidaria o resultado. Para minimizar a perda de beads durante o ensaio, siga o protocolo descrito aqui e use somente micropipetas e ponteiras validadas. A mistura de microesferas fornecidas contém uma quantidade otimizada cuidadosamente de conjuntos de microesferas sendo suporte para as probes HLA de alelos específicos. Qualquer alteração na mistura iria significativamente afetar a exatidão do ensaio e irá invalidar o resultado.

Todos os equipamentos (ex., termociclador, pipetas, analisador Luminex® e o bloco de aquecimento) devem ser calibrados de acordo com as recomendações de seus fabricantes.

Para obter informações lote-específico, consulte o documento Informações Sonda e Bead (Bead Probe Information).

Devido à complexidade das definições alélicas do sistema HLA, o especialista da área deve revisar e interpretar os dados e atribuir a tipagem HLA. Este teste não deve ser utilizado como a única fonte na tomada de decisão clínica.

Valores esperados:

13.3 Amplificação

Espera-se que a mistura de primer HLA Loco-específico fornecido produza quantidade adequada de produto amplificado. A falha na detecção do produto amplificado em gel de agarose corado com brometo de etídio invalida os resultados do teste.

Amplificação de DNA esta sujeita à contaminação por DNA anteriormente amplificado. A detecção de contaminação (fazendo uso do controle negativo na reação ou teste de esfregaço para detecção de contaminação de produto de amplificação) pode invalidar os resultados do teste.

13.4 Analisador Luminex

O Analisador Labscan™ 3D é um citômetro de fluxo avançado que requer manutenção e calibração diária. Consulte o Manual do Usuário do Labscan 3D (Luminex FLEXMAP 3D®) para conhecer todas as operações de manutenções necessárias. A manutenção diária inclui procedimentos de inicialização e desligamento. Para melhor desempenho, calibre o equipamento sempre que o valor de Δ Cal Temp apresentada na tela do software for superior a $\pm 5^{\circ}\text{C}$ no Labscan 3D .

O equipamento deverá ser calibrado antes da leitura das amostras LabType® XR e CWD.

13.5 Aquisição de Dados e Análise

Para obter dados válidos, dois parâmetros – Intensidade Média de Fluorescência (MFI) e a contagem – deverão ser monitorados para cada aquisição de dados. A contagem representa o número total de beads que foram analisadas, e a contagem deverá ser superior a 75 beads. Uma redução significativa na contagem sugere perda de beads durante a aquisição e ensaio da amostra e pode invalidar o teste.

O MFI representa o sinal PE detectado dentro das beads contadas. MFI varia de acordo com o resultado da reação. O valor de MFI esperado da sonda controle positivo pode variar de lote a lote, e também devido a quantidade e/ou qualidade da amostra, técnica, calibração e condição de todos os reagentes, incluindo o DNA amplificado, tampões, SAPE e a mistura de beads.

A informação do CQ fornecido no software de análise apresenta valores específicos ao lote, obtidos utilizando-se DNA que atendem ao requisito da amostra (conforme descrito em Coleta e Preparo da Amostra).

Usuários são altamente recomendados a determinar sua própria faixa para o valor de controle utilizando amostras de referência na validação de cada lote. A redução ou elevação significativa no MFI da sonda de controle positivo pode sugerir quantidade e/ou qualidade

inadequadas da amostra, eficácia reduzida do ensaio ou falha do equipamento e pode invalidar os resultados do teste.

14. GARANTIA

A **Biometrix Diagnóstica LTDA** situada na Rua Estrada da Graciosa, 1.081 CEP: 82840-360, Curitiba, Paraná, fornece garantia de todos os produtos por ela revendidos dentro dos seguintes termos:

Garantia

O produto **LABType SSO** é garantido pela Biometrix contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.

Exceções na garantia:

- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.

Extinção da garantia:

Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

BIOMETRIX DIAGNÓSTICA LTDA.

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

Tel.: (41) 2108-5250 Fax: (41) 2108-5252 DDG: 0800-7260504

E-mail: biometrix@biometrix.com.br Website: www.biometrix.com.br

CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

One Lambda, Inc.

21001 Kittridge Street

Canoga Park – CA – EUA

REGISTRO ANVISA

80298490005

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Flavia Stival

CRF/PR: 26565

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

REVISÃO	DATA	DESCRIÇÃO
00	05/2017	Elaboração