

Testes de Tipagem LABType™ SSO

REF	ID de catálogo	Nome do produto	ID de catálogo	Nome do produto
	RSSO1A*	LABType™ SSO Class I A Locus Typing Test	RSO1AT*	LABType™ SSO Class I A Locus Typing Test - 20 tests
	RSSO1B*	LABType™ SSO Class I B Locus Typing Test	RSO1BT*	LABType™ SSO Class I B Locus Typing Test - 20 tests
	RSSO1S4*	LABType™ SSO Class I Bw4 Supplement Typing Test	RSO1S4T*	LABType™ SSO Class I Bw4 Supplement Typing Test - 20 tests
	RSSO1S1*	LABType™ SSO Class I B7 Supplement Typing Test	RSO1S1T*	LABType™ SSO Class I B7 Supplement Typing Test - 20 tests
	RSSO1E47*	LABType™ SSO Class I Exon 4-7 Supplement Typing Test	RSO1E47T*	LABType™ SSO Class I Exon 4-7 Supplement Typing Test - 20 tests
	RSSO1C	LABType™ SSO Class I C Locus Typing Test	RSO1CT	LABType™ SSO Class I C Locus Typing Test - 20 tests
	RSSO2P	LABType™ SSO Class II DPA1/DPB1 Typing Test	RSO2PT	LABType™ SSO Class II DPA1/DPB1 Typing Test - 20 tests
	RSSO2Q	LABType™ SSO Class II DQA1/DQB1 Typing Test	RSO2QT	LABType™ SSO Class II DQA1/DQB1 Typing Test - 20 tests
	RSSO2B1*	LABType™ SSO Class II DRB1 Typing Test	RSO2B1T*	LABType™ SSO Class II DRB1 Typing Test - 20 tests
	RSSO2345*	LABType™ SSO Class II DRB3,4,5 Typing Test	RSO2345T*	LABType™ SSO Class II DRB3,4,5 Typing Test - 20 tests
	RSSOH1A*	LABType™ HD Class I A Locus Typing Test	RSOH1AT*	LABType™ HD Class I A Locus Typing Test - 20 tests
	RSSOH1B*	LABType™ HD Class I B Locus Typing Test	RSOH1BT*	LABType™ HD Class I B Locus Typing Test - 20 tests
	RSSOH1C	LABType™ HD Class I C Locus Typing Test	RSOH1CT	LABType™ HD Class I C Locus Typing Test - 20 tests
	RSSOH2B1*	LABType™ HD Class II DRB1 Typing Test	RSOH2B1T*	LABType™ HD Class II DRB1 Typing Test - 20 tests
	RSSOMICA	LABType™ SSO MICA		

IVD Para utilização em diagnósticos in vitro.

UTILIZAÇÃO PREVISTA



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



RESUMO E EXPLICAÇÃO

Historicamente, o método estabelecido para a identificação de antígenos HLA era o teste de linfocitotoxicidade.¹ Todavia, com o advento das tecnologias de PCR, as técnicas de tipagem tecidual baseadas em DNA tornaram-se uma rotina laboratorial. Para a maioria das metodologias baseadas em DNA, o processo de PCR é utilizado apenas como um passo de amplificação para obter o DNA alvo necessário. Por consequência, o processo de tipagem HLA requer um passo de pós-amplificação para discriminar entre os vários alelos (por exemplo, RFLP, SSOP, Dot Blot inverso). O LABType™ SSO utiliza sondas oligonucleotídicas específicas para a sequência (SSO) ligadas a microesferas codificadas por fluorescência para identificar os alelos codificados pelo DNA da amostra. A introdução é a etapa da reação em cadeia da polimerase (PCR), para amplificação do DNA alvo, ligado à hibridização e detecção em uma mistura de reação única, torna este método adequado tanto para os testes de pequena escala como para os de grande escala. Ao contrário da escala de reação de linfocitotoxicidade (1 = negativo a 8 = positivo), os resultados do teste LABType™ são positivos ou negativos. Eliminando a necessidade de uma interpretação complexa dos resultados. Além disto, as alterações únicas de nucleotídeos podem ser discriminatórias no PCR-SSO, enquanto que os grupos que estabelecem reações cruzadas (CREGs) proporcionam grandes desafios para a tipagem sorológica.

PRINCÍPIOS

O LABType™ aplica a tecnologia Luminex® ao método de tipagem de DNA SSO reverso. Primeiro, o DNA alvo é amplificado na PCR utilizando um primer específico para o grupo. O produto de PCR é biotilado, o que permite ser detectado utilizando estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina (SAPE).

O produto da PCR é desnaturado e re-hibridizado nas sondas complementares de DNA conjugadas com as microesferas codificadas por fluorescência. Um analisador de fluxo, o LABScan™ 100 (Luminex® 100/200) ou o LABScan3D™ (Luminex® FLEXMAP 3D), identifica a intensidade fluorescente da PE (ficoeritrina) em cada microesfera. A atribuição da tipagem HLA baseia-se no padrão de reação comparado com os padrões associados às sequências de genes HLA publicadas.

REAGENTES

A. Identificação

O sistema de tipagem de DNA LABType™ SSO fornece sondas oligonucleotídicas sequência-específica, imobilizadas nas microesferas, para identificação dos alelos HLA em amostras de DNA genômico amplificado através de uma reação controlada de hibridização DNA-DNA, seguida de uma análise de fluxo utilizando o analisador de fluxo LABScan™ 100 ou LABScan3D™. O sistema é composto pelos seguintes sistemas:

- Mistura pré-otimizada e testada de microesferas com sondas ligadas por união covalente
- Tampões de reação de hibridização para facilitar a fixação do DNA alvo à sonda
- Tampão de lavagem para eliminar o DNA não ligado
- Tampão SAPE para diluir a solução Stock SAPE
- Reagentes de amplificação do DNA (mistura pré-otimizada de primer de HLA loco-específico): É essencial usar mix de primer e a mistura de esferas loco-específicos com cada produto LABType. Os reagentes são específicos aos lotes e não são intercambiáveis entre lotes.
- D-mix (mistura especialmente formulada de tampão de amplificação).

A mistura de microesferas é composta por um conjunto de microesferas com marcação fluorescente que possuem sondas oligonucleotídicas específicas de sequência única para alelos HLA. Cada mistura de microesferas inclui microesferas de controle negativo e positivo para a subtração dos sinais de fundo não específicos e para a normalização dos dados brutos para ajustar a possível variação em quantidade de amostras e eficiência da reação. As misturas de microesferas são pré-otimizadas para produtos de PCR particulares obtidos através da amplificação de DNA, utilizando as respectivas misturas de primer HLA locus-específicas. As misturas de primer HLA locus-específicas são pré-otimizadas para a amplificação de genes HLA específicos de 40 ng de DNA genômico purificado em um volume de 20 µl quando utilizadas em conjunto com o D-mix, a quantidade prescrita de Taq polimerase recombinante e o perfil da reação de PCR descrito abaixo. Para cada lote, consultar a folha de trabalho fornecida para os alelos de HLA específicos que podem ser identificados por cada sonda utilizando os procedimentos indicados abaixo. Para saber quais sondas específicas por lote, consultar o documento [*Bead Probe Information*](#).



B. Atenção ou Aviso

1. Designação da FDA: IVD
2. **Atenção:** O brometo de etídio, utilizado para a coloração de gel e que não está incluído com este produto, é um agente cancerígeno comprovado. Manipular com precaução adequada. Pode ser prejudicial se for absorvido pela pele. Evitar espirrar nos os olhos, pele ou na roupa. Manter hermeticamente fechado. Lavar cuidadosamente após o uso. Lavar a área de derramamento com jato de água.
3. **Atenção:** O Tampão de Desnaturação e o Tampão de Neutralização são corrosivos e podem provocar queimaduras. Em caso de contato, lavar imediatamente os olhos ou a pele com água abundante durante pelo menos 15 minutos e, ao mesmo tempo, despir a roupa e tirar os sapatos contaminados (consultar MSDS).
4. **Aviso:** A Mistura de Esferas LABType™ SSO é sensível à luz e deve ser protegida da mesma.
5. **Aviso:** Utilizar a Mistura de Esferas LABType™ SSO num período de três meses após ter sido descongelado.
6. Consultar a ficha de dados de segurança dos materiais para obter informações detalhadas.

C. Preparação dos reagentes para utilização

Consultar [Instruções de Utilização](#) neste documento.



D. Instruções de armazenamento

Todos os testes de tipagem LABType™ SSO podem ser armazenados com segurança congelados a uma temperatura de -80° a -20°C na embalagem do produto. Evitar o manuseamento desnecessário. Recomendamos que mantenha o pacote completo intacto e congelado após a sua recepção, até à sua utilização. Consultar as condições de armazenagem dos componentes individuais na tabela abaixo.

Componente	Condições de armazenagem
Mistura de microesferas LABType® SSO	De -80°C a -20°C <i>Proteger da luz</i> <i>Após descongelar, armazenar entre 2°C e 8°C por 3 meses</i> <i>Não recongelar novamente</i>
Conjunto de primer locus-específico	De -80°C a -20°C <i>É possível repetir ciclos de congelamento-descongelamento; armazenar congelado</i>
Tampão de desnaturação	De -80°C a 25°C
Tampão de neutralização	De -80°C a 25°C
Tampão de hibridização	De -80°C a 25°C
Tampão de lavagem	De -80°C a 25°C
Tampão SAPE	De -80°C a -20°C <i>Após descongelar, armazenar entre 2°C e 8°C por 3 meses</i>
Conjunto de Primer D-mix	De -80°C a -20°C <i>É possível repetir ciclos de congelamento-descongelamento; armazenar congelado</i>

E. Indicações de Instabilidade

1. As microesferas que apresentam descoloração, ou aglomeração que não se consegue remover quando submetidas ao agitador vortex, devem ser consideradas inutilizadas.
2. Se os sais tiverem precipitados para fora de qualquer produto durante o transporte ou armazenamento, voltar a dissolver submetendo a agitação prolongada à temperatura ambiente (de 20° a 25 °C).

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

REQUISITOS DO INSTRUMENTO

- Analisador de fluxo LABScan™ 100 (Luminex 100/200) ou LABScan3D™ (Luminex® FLEXMAP 3D®)
- Plataforma Luminex® XY (acessório opcional para a leitura automática de 96 amostras no analisador de fluxo LABScan™ 100 da Luminex Corporation)
- Centrífuga
- Rotor para tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (14 000 a 18 000 g)
- Rotor do tipo cesto de oscilação para microplacas de 96 poços (1 000 a 1 300 g)
- Misturador tipo vortex com velocidade ajustável
- Termociclador – Veriti™ 96-Well Thermal Cycler ou outro termociclador
 - Formato em bloco, liga de 0,2 ml
 - Formato padrão de 96 poços de 0,2 ml
 - Tampa aquecida com capacidade de manter uma temperatura de 103 °C
 - Velocidade máxima de rampa de bloco: 3,90 °C/seg
 - Velocidade máxima de rampa de amostra: 3,35 °C/seg
 - Capaz de processar em modo de emulação de 9600 à velocidade de rampa de amostra de +0,8 °C/seg e -1,6 °C/seg
 - Diferencial máximo de temperatura de 25 °C em todo o bloco, 5 °C de zona a zona
 - Zona de precisão de temperatura: ±0,25 °C (35–99,9 °C)
 - Zona de faixa de temperatura: 4,0 °C a 99,9 °C
 - Zona de uniformidade de temperatura: <0,5 °C (20 seg após alcançar 95 °C)
 - Zona de faixa de volume de PCR: 10 a 80 µl

COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- A. O DNA pode ser purificado a partir de amostras de várias fontes, incluindo sangue humano total, linfócitos isolados (buffy coat) do sangue, sangue em papel de filtro, gânglios linfáticos, esfregaços bucais e medula óssea através de um método validado que atenda aos critérios abaixo. A amostra de DNA a utilizar para o PCR deverá ser novamente suspensa em água esterilizada ou em 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0 – 9,0, em uma concentração de 20 ng/µl com uma razão de A260/A280 de 1,65 a 1,80. Outras especificações usadas devem ser validadas pelo laboratório.
- B. As amostras não devem conter nenhum inibidor de DNA polimerase nem devem voltar a ser suspensas em soluções contendo agentes quelantes, como EDTA, com concentração superior a 0,5 mM.
- C. As amostras de DNA podem ser usadas imediatamente depois do isolamento ou armazenadas a -20 °C, ou menos, durante longos períodos de tempo sem que ocorram efeitos adversos nos resultados.
- D. As amostras de DNA deverão ser transportadas a 4 °C, ou menos, para se conservar a sua integridade durante o transporte.

PROCEDIMENTO

A. Materiais fornecidos

NOTA: Os volumes fornecidos são ligeiramente superiores à quantidade necessária para o teste. Esta quantidade tem em conta as perdas inadvertidas que podem resultar da pipetagem. Não misturar componentes de lotes diferentes dos produtos.

100 testes por embalagem		20 testes por embalagem	
2,25 ml de Tampão de Desnaturação – 1 frasco	4,95 ml de Tampão SAPE – 1 frasco	2,25 ml de Tampão de Desnaturação – 1 frasco	990 µl de Tampão SAPE – 1 frasco
2,5 ml de Tampão de Neutralização – 1 frasco	1,38 ml de Conjunto de Primer D-mix – 2 frascos de 690 µl cada	100 µl de Tampão de Neutralização – 1 frasco	276 µl de Conjunto de Primer D-Mix – 1 frasco
3,4 ml de Tampão de Hibridização – 1 frasco	400 µl de Conjunto de Primer Locus-específico – 1 frasco	680 µl de Tampão de Hibridização – 1 frasco	80 µl de Conjunto de Primer Locus-específico – 1 frasco
55 ml de Tampão de Lavagem – 1 frasco	Mistura de microsferas – 400 µl de LABType™ SSO primário – 1 frasco * 20 µl de suplemento – 1 frasco*	10 ml de Tampão de Lavagem – 1 frasco	80 µl de Mistura de microsferas LABType™ SSO ou HD – 1 frasco

***NOTA:** Os kits LABType™ (100 testes) podem conter dois frascos de microsferas, conforme a necessidade, para resoluções otimizadas contínuas: uma mistura de esferas primárias e uma mistura de esferas suplementares.

B. Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Água deionizada
2. Etanol a 70%
3. Hipoclorito de cloro a 20%
4. Estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina – SAPE
5. Fluido de proteção (N.º Cat. OLI LXSF20 ou LSXF20X5)
6. Taq polimerase recombinante (IDs de catálogo OLI TAQ30, TAQ50 e TAQ75)
7. Tubos descartáveis de 15 a 50 ml
8. Placa, ou tubos, para PCR de parede fina com 96 poços e suporte que suporta de 1 000 a 1 300 g em uma centrífuga

Aviso: A placa PCR tem de estar em firme contato com o bloco de aquecimento.

9. Selos da placa

NOTA: As placas para PCR (25) e as películas para selagem da placa (180) suficientes para 2 400 amostras podem ser encomendadas à One Lambda (N.º Cat. OLI PCRTRAC)

10. Aparelho de eletroforese/ fonte de alimentação/ transiluminador UV com capacidade mínima de 150V (Fotodyne FOTO/UV@21 ou equivalente)
11. Sistema de documentação fotográfica ou de imagem
12. Tampão de corrida para eletroforese – exemplo: 1x tampão TBE (89mM Tris-borato; 2 mM de EDTA dissódico, pH 8,0) com 0,5 µg/ml de brometo de etídio ou Tampão 5XTBE com brometo de etídio
13. Agarose de grau de electroforese (por exemplo, FMC Seakem® LE ou equivalente)
14. Almofada emborrachada de PCR
15. Banho de gelo moído ou equivalente.

C. Instruções de utilização

Aviso: Deve-se ter especial cuidado no processo de elaboração de alíquotas. O não cumprimento dos passos que se descrevem de seguida poderá dar origem a perda de reagente.

1. Manuseamento e conservação das microsferas

- a. A utilização dos instrumentos descartáveis recomendados (tubos, tabuleiros e pontas) pode minimizar a perda de esferas causada por adesão não específica. (Consultar “Materiais necessários, mas não fornecidos”).

- b. As esferas LABType™ SSO podem assentar e agregar-se se forem deixadas num tubo. As esferas têm de ser distribuídas uniformemente antes de dispensar. Misturar sempre as microesferas vigorosamente, pipetando várias vezes ou submetendo a agitação vortex na posição horizontal durante 10 a 30 segundos, ou tanto tempo quanto seja necessário para obter uma mistura totalmente homogênea.
- c. Para os produtos LABType™ SSO HD recomendamos os seguintes procedimentos para ajudar a prevenir a aglomeração/aglutinação de microesferas. Imediatamente após a remoção do sobrenadante no passo 2f, 2g e 3c no Procedimento de Teste abaixo, remover o máximo possível do líquido invertendo a placa e dando batidas muito leves sobre uma toalha de papel seca. Colocar na placa uma película para selagem de placas e submeter ao agitador vortex misturando muito bem a baixa velocidade para soltar o concentrado. Avançar para o próximo passo descrito.
- d. As microesferas LABType™ SSO são embaladas dentro de pacotes em folha de alumínio. Não retirar as microesferas do saco de alumínio até à sua utilização.
- e. As microesferas LABType™ SSO contêm corante fluorescente interno, bem como sondas específicas para alelos HLA, ligadas às suas superfícies. Para evitar o fotobranqueamento das microesferas, proteger as esferas contra a luz durante a utilização e o armazenamento. Armazenar as esferas a -20 °C na embalagem, bem fechado, até à sua utilização. Cobrir as microesferas com folha de alumínio, ou equivalente, durante o ensaio.

Aviso:

- *Depois de descongelar as esferas, armazená-las a uma temperatura entre 2° e 8° C e utilizá-las, no máximo, dentro de 3 meses. Não voltar a congelar as esferas.*
- *Abrir os sacos que contêm a Mistura de Primer de Amplificação e o D-Mix apenas na área de pré-amplificação. Armazenar estes itens a uma temperatura entre -80° e -20 °C na área de pré-amplificação.*

2. Amplificação (preparar na área de pré-amplificação)

- a. Introduzir o “Programa de PCR LABType™” no termociclador, como indicado na **Tabela 2**. Confirmar todos os parâmetros.
- b. Ligar o termociclador para aquecer a tampa.
- c. Descongelar o DNA, os primers de amplificação e o D-Mix. Mantê-los no gelo até à utilização.
- d. Ajustar a concentração de DNA genômico para 20 ng/μl usando água esterilizada.
- e. Submeter o D-mix e o Primer de Amplificação ao agitador vortex durante 15 segundos; centrifugar durante 3 a 5 segundos.
- f. Utilizando a Tabela 1, abaixo, misturar o volume indicado de D-mix e dos Primers. Submeter ao vortex durante 15 segundos e colocar no gelo. Para uma pipetagem precisa da Taq polimerase, recomendamos que prepare a mistura principal para, pelo menos, 10 reações.
- g. Acrescentar a Taq polimerase imediatamente antes de utilizar.

Tabela 1: Mistura de amplificação

N.º 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)

[‡]o cálculo é gerado para 108 amostras para evitar faltas.

- h. Pipetar 2 μl de DNA (a 20 ng/μl) para o fundo de um tubo (para um volume final de 20 μl por reação de PCR). Guardar os tubos ou as placas parcialmente tapados para evitar a evaporação e contaminação.
- i. Acrescentar uma quantidade apropriada de Taq polimerase (por exemplo, 0,2 μl (tipicamente a 5 U/μl) por reação de 20 μl) à Mistura de Amplificação preparada no Passo 2.f.
- j. Submeter ao vortex durante alguns segundos e centrifugar durante 3 a 5 segundos.
- k. Aliquotar 18 μl de Mistura de Amplificação dentro de cada poço contendo DNA.

Aviso: Para evitar a contaminação cruzada, não tocar no DNA previamente aliquotado no fundo.

- l. Tampar ou vedar. Se estiver a utilizar uma película para selagem da placa, verificar se está bem fixada à margem de cada poço. Colocar uma almofada emborrachada de PCR apropriada para o seu termociclador na placa antes de fechar a tampa. Fechar e apertar a tampa do termociclador.
- m. Executar o “Programa de PCR LABType™ SSO”, apresentado na Tabela 2.
- n. No caso do Verti™ 96-Well Thermal Cycler, configurar a “velocidade de rampa” para o programa 9600. Para outros sistemas, consultar a documentação do fabricante para ajustar a velocidade de rampa de acordo com as especificações definidas em Instrumentos necessários. A utilização de uma velocidade de rampa muito diferente afetará a eficiência da amplificação e os resultados finais.

Tabela 2: Programa de PCR LABType™ SSO

Passo	Temperatura e tempo de incubação	Quant. de ciclos
Passo 1:	96 °C 03:00	1
Passo 2:	96 °C 00:20	5
	60 °C 00:20	
	72 °C 00:20	
Passo 3:	96 °C 00:10	30
	60 °C 00:15	
	72 °C 00:20	
Passo 4:	72 °C 10:00	1
Passo 5:	4 °C para sempre	1

- o. O DNA amplificado está agora pronto para ser testado utilizando o Procedimento de Teste indicado na Seção D.

NOTA: *No entanto, recomendamos que utilize primeiro de 2 a 5 µl de DNA amplificado para análise por gel de eletroforese. A confirmação de um produto de amplificação (banda) antes do ensaio de hibridação assegura a produção de sinais.*

- p. Se o produto amplificado não é usado imediatamente, armazenar a placa de DNA a uma temperatura de -80° a -20 °C por até um mês.

3. Configuração do teste

- a. Ligar o LABScan™ 100 e a Plataforma XY ou LABScan3D™ e seguir o procedimento de inicialização descrito na Seção D das Instruções de Uso. O LABScan™ 100 ou LABScan3D™ precisa de pelo menos 30 minutos para aquecer.
- b. Ligar o termociclador e executar o programa para 60 °C HOLD, ou equivalente, durante pelo menos 1 hora e 30 minutos (ou deixar em hold). Tenha uma almofada emborrachada PCR apropriada para o seu termociclador. Esperar até a tampa aquecida do termociclador atingir a temperatura apropriada antes de o utilizar. Utilizar um suporte apropriado para placa PCR de 96 poços para assegurar uma temperatura de incubação adequada.
- c. Retirar todos os reagentes (exceto o frasco castanho de 100X SAPE) do armazenamento e deixá-los atingir a temperatura ambiente. Aliquotar os volumes necessários dos reagentes para dentro de recipientes limpos. (Utilizar as tabelas abaixo como referência). Preparar 1X SAPE durante o terceiro passo de lavagem. Retirar o frasco de 100X SAPE do armazenamento apenas quando for necessário e retorne-o imediatamente após a utilização, a uma temperatura entre 2° e 8 °C. Voltar a Mistura de microesferas e do Tampão SAPE a uma temperatura entre 2° e 8 °C quando não utilizado mais. (Não voltar a congelar a Mistura de microesferas depois de descongelada.)

Atenção: *Não voltar a congelar a mistura de microesferas depois de descongelar.*

4. LABType™ Bead Preparation (para kit de 100 testes contendo dois frascos de esferas):

- Para kits LABType™ contendo 2 frascos de microesferas, realizar uma rotação rápida aos tubos (de 10 a 15 segundos a 100 RCF (força centrífuga relativa) na maioria das centrífugas pequenas) imediatamente após o descongelamento.
- Colocar os frascos num agitador vortex à força média durante 20 segundos e, em seguida, dar outra rotação rápida como descrito acima.
- Pegar o frasco de esferas primárias e lentamente, mas cuidadosamente, pipetar para cima e para baixo várias vezes utilizando P1000 ou equivalente para misturar a solução de microesferas.
- Utilizando a mesma ponteira da pipeta do passo (c), transferir cuidadosamente todo o volume de microesferas primárias para o frasco de esferas suplementares.
- Eliminar o frasco vazio das esferas primárias. O tubo suplementar é rotulado com o identificador do novo lote referente às esferas combinadas. O número deste lote é associado aos catálogos da análise e folha de dados corretos.
- Misturar as microesferas combinadas vigorosamente, submetendo o tubo tampado para agitação vortex 3 vezes, durante 10 segundos cada vez, para obter uma mistura homogênea de esferas. Utilizar imediatamente ou armazenar nas condições descritas na página 2, Instruções de Armazenamento. Agitar o frasco de esferas num vortex a velocidade média durante pelo menos 20 segundos imediatamente antes de utilizar.

Tabela 3: Preparação do reagente

Reagente	Quantidade por teste	Método de preparação e sugestões
Mistura de microesferas	4 µl	<ul style="list-style-type: none"> Aliquotar o volume apropriado e o volume suplementar* para a quantidade de testes necessários dentro de um tubo limpo e à temperatura ambiente. Proteger da luz. Utilizar todo o conteúdo do tubo com a Mistura de Esferas para 96 amostras. Submeter ao agitador vortex imediatamente antes de utilizar.
Tampão de hibridização	34 µl	<ul style="list-style-type: none"> Aliquotar para exatamente a mesma quantidade de testes, tal como utilizado para a Mistura de microesferas. Acrescentar à Mistura de microesferas previamente distribuída em alíquota para preparar a Mistura de Hibridização. Manter à temperatura ambiente (20° a 25 °C) até utilizar.
Tampão de lavagem	480 µl	<ul style="list-style-type: none"> Aliquotar o volume apropriado, mais o volume suplementar* para a quantidade de testes necessários e manter à temperatura ambiente (20° a 25 °C). Utilizar todo o conteúdo em um reservatório de soluções para 96 amostras.
Tampão de desnaturação	2,5 µl	<ul style="list-style-type: none"> Aliquotar o volume apropriado, mais o volume suplementar* para a quantidade de testes. Utilizar todo o conteúdo em um reservatório de soluções para 96 amostras. Manter à temperatura ambiente (20° a 25 °C).
Tampão de neutralização	5 µl	<ul style="list-style-type: none"> Aliquotar o volume apropriado, mais o volume suplementar* para a quantidade de testes. Utilizar a totalidade dos 2,5 ml para 96 amostras. Manter à temperatura ambiente (20° a 25 °C).
Stock SAPE (100X)	0,5 µl	<ul style="list-style-type: none"> Durante o último passo de centrifugação, preparar uma solução 1X SAPE fazendo uma diluição de 1:100 de Stock SAPE com Tampão SAPE para a quantidade de testes apropriada, mais o volume suplementar.*
Tampão SAPE	49,5 µl	<ul style="list-style-type: none"> Proteger da luz. Preparar uma quantidade suficiente de solução 1X SAPE para 96 amostras (para cerca de 110 amostras, dependendo do erro de pipetagem observado). Manter o frasco de Stock SAPE entre 2° e 8 °C.

***NOTA:** O volume suplementar necessário depende da técnica de pipetagem utilizada e do estado da calibração do equipamento. Utilizar um volume total de Mistura de microesferas no tubo fornecido (suficiente para aproximadamente 110 testes) para a realização de 96 testes. Preparar 1X SAPE para 115 testes e utilizar o volume total de outros reagentes para evitar que falte. Recomendamos a calibração de todos os dispositivos de pipetagem e o teste destes dispositivos elaborando alíquotas com água. No que se refere aos reagentes fornecidos em excesso, tais como os Tampões de Desnaturação e Neutralização, pode utilizar um suporte de soluções para

Tabela 4: Volumes de reagente

Quantidade de testes	Tampão de desnaturação (µl)	Tampão de neutralização (µl)	Tampão de hibridação (µl)	Tampão de lavagem (µl) Método de placa	Mistura de microesferas (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: Volumes de SAPE e de Tampão SAPE

Quantidade de testes	Stock SAPE Volume (µl)	Tampão SAPE Volume (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

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

D. Procedimento do teste

PRECAUÇÕES TÉCNICAS

1. Para analisar uma pequena quantidade de amostras (48 ou menos) pode utilizar uma placa de 96 poços, uma placa que tenha sido cortada para conter o número de poços apropriado ou uma strip de tira PCR de parede fina de 0,2 ml. Certificar-se de que utiliza um suporte para tubos ao utilizar uma placa cortada ou um canal em tira.
2. A mistura das amostras numa placa de 96 poços envolve a selagem da placa e a baixa velocidade no vortex durante alguns segundos. Ajustar a velocidade do agitador vortex para que o líquido dentro da placa PCR de 96 poços seja suficientemente agitado sem que extravase. Tomar nota da padronização de velocidade e utilizá-la para o método da placa de 96 poços.
3. A selagem da placa PCR de 96 poços deve ser feita com cuidado e na sua totalidade para evitar a contaminação das amostras entre poços. Selar a placa, empurrando a película contra cada margem dos 96 poços. Não voltar a utilizar as películas para selagem das placas. Utilizar uma película nova para cada passo que necessite a aplicação de uma película para selagem de placas. Pode utilizar uma pipeta repetidora, sempre que for aplicável. No entanto, as pipetas repetidoras não são, normalmente, tão precisas na distribuição de volume.
4. Recomendamos a calibração regular e a verificação manual do volume para cada volume utilizado na técnica. Não utilizar uma pipeta repetidora para dispensar a Mistura de Hibridação.

1. Desnaturação/Neutralização

- a. Preparar um banho de gelo moído.
- b. Colocar uma placa limpa de 96 poços num suporte de placas.
- c. Transferir 2,5 µl de Tampão de Desnaturação para dentro de um poço de uma placa de 96 poços limpa.
- d. Acrescentar 5 µl de cada DNA amplificado. Saber a localização e a ID das amostras pipetadas. Misturar bem (de preferência, pipetando para cima e para baixo), e incubar à temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C) durante 10 minutos.

NOTA: O DNA amplificado pode ser aliqotado primeiro, com a adição posterior de Tampão de Desnaturação.

- e. Acrescentar 5 µl de Tampão de Neutralização com uma pipeta e misturar bem (de preferência, pipetando para cima e para baixo). Observar a mudança de cor, de cor-de-rosa vivo para amarelo claro ou transparente.
- f. Colocar a placa PCR com o produto PCR neutralizado no banho de gelo.

Aviso: Evitar a contaminação do produto PCR com água.

2. Hibridação

NOTA: Ligar o termociclador e executar o programa de manutenção em 60 °C para aquecer o bloco térmico.

- a. Combinar os volumes apropriados da Mistura de microesferas e do Tampão de Hibridização para preparar a Mistura de Hibridização.
- b. Acrescentar 38 µl de Mistura de Hibridização a cada poço.
- c. Selar a placa com a película e submeter ao agitador vortex misturando muito bem a baixa velocidade.
- d. Remover do suporte de placa e colocar a placa PCR no termociclador pré-aquecido (60 °C).
- e. Colocar a almofada emborrachada PCR sobre a placa ou tampas dos tubos PCR. Fechar e apertar a tampa. Incubar durante 15 minutos.
- f. Colocar a placa no suporte e retirar a película de selagem da placa. Acrescentar rapidamente 100 µl de Tampão de Lavagem a cada poço. Selar a placa com a película. Centrifugar a placa durante 5 minutos a 1 000-1 300 g. Colocar a placa no suporte e remover o tampão de lavagem.
- g. Repetir o passo 2.f acima mais duas vezes, fazendo um total de três passos de lavagem. Lembrar-se de preparar 1X de solução SAPE durante a terceira centrifugação.

3. Marcação

- a. Colocar a placa no suporte. Acrescentar 50 µl de solução SAPE 1X a cada poço. Colocar o selo de placa e submeter ao agitador vortex misturando muito bem a baixa velocidade. Colocar a placa no termociclador pré-aquecido (60 °C). Colocar a almofada emborrachada PCR sobre a placa ou tampas dos tubos PCR. Fechar e apertar a tampa. Incubar durante 5 minutos.
- b. Retirar a placa. Colocar a placa no suporte. Retirar a película e acrescentar rapidamente 100 µl de Tampão de Lavagem em cada poço.
- c. Selar a placa com o selo de placas. Centrifugar a placa durante 5 minutos a 1 000 – 1 300 g. Colocar a placa no suporte e remover o sobrenadante.
- d. Acrescentar 70 µl de Tampão de Lavagem em cada poço. Misturar suavemente com a pipeta. Transferir para a placa de leitura utilizando uma pipeta de 8 ou 12 canais. Evitar a contaminação entre amostras utilizando ponteiras novas.
- e. **NOTA:** O volume final deve ser de pelo menos 80 µl.
- f. Tampar a placa com película para selagem de placas e folha de alumínio. Manter a placa no escuro a 4 °C até colocar no LABScan™ 100 ou LABScan3D™ para ser lida.
- g. Para obter os melhores resultados, ler as amostras logo que possível. O armazenamento prolongado das amostras (mais de 4 horas) pode resultar em perda do sinal. Guardar as amostras a 4 °C, no escuro, com uma película para selagem de placas instalada, se não puder ler imediatamente. Certifique-se de misturar muito bem as amostras imediatamente antes da leitura.

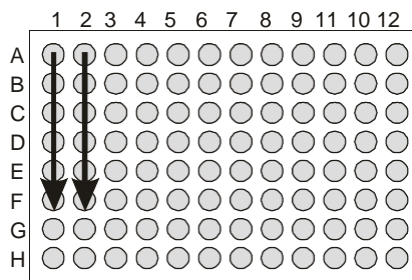


Figura 1 A Plataforma Luminex® XY lê a amostra na seguinte sequência: A1 a H1, A2 a H2, A12 a H12.

E. Aquisição de dados

NOTA: A descrição abaixo é um guia geral de aquisição de dados. Detalhes da utilização do LABScan™ 100 ou LABScan3D™ encontram-se no Manual do Utilizador do Luminex® 100/200³ ou Luminex® FLEXMAP 3D⁴.

1. Ligar o sistema e configurar o LABScan™ 100 e/ou LABScan3D™ para aquisição de amostras e calibração de acordo com o Manual do Utilizador do Luminex para a versão do software que está sendo utilizado.
2. Escolher um template/protocolo de acordo com a ID de catálogo e o número de lote do produto.
 - a. Os modelos/protocolos de aquisição estão disponíveis na One Lambda em CD ou pode ser feito o download no site da One Lambda na Internet.
 - b. Para criar o seu próprio template, seguir as instruções no capítulo “Aquisição” do “Manual do Utilizador do Luminex”. Clicar em “Start up”.
3. Criar um nome no arquivo para as amostras que vão ser analisadas.
4. Certificar-se de que as definições do modelo/protocolo estão corretas.
5. Inserir as IDs das amostras.

Aviso: Se a mesma amostra for testada mais de uma vez, deverá ser-lhe atribuída uma ID diferente.
6. A placa está pronta a ser analisada.
7. Colocar a placa na plataforma XY e encher o reservatório com fluído de proteção.
8. Clique no botão START para iniciar a sessão. Após a análise das amostras, os dados obtidos devem ser guardados como um arquivo .csv.
9. No final da sessão, lavar a máquina 2 vezes com fluído de proteção.

NOTA: É obrigatória a utilização das versões do software Luminex® - LABScan 100 (xPONENT® 3.1* ou superior); LABScan 3D (xPONENT 4.2 ou superior). Para análise LABType HD - não se esqueça de designar o novo lote (suplementar) quando ler e analisar os dados. Capturar e guardar todo o arquivo da execução do analisador de fluxo Luminex® para análise de dados.

RESULTADOS

A. Cálculo dos dados

1. A intensidade média de fluorescência (MFI) gerada pelo software Luminex® Data Collector, ou equivalente, contém a FI para cada esfera (ou sonda ligada à esfera) por amostra. A percentagem do valor positivo é calculada da seguinte forma:

$$\text{Percentagem de valor positivo} = 100 \times \frac{\text{MFI (Sonda n)} - \text{MFI (Controlo Negativo da Sonda)}}{\text{MFI (Controlo Positivo da Sonda)} - \text{MFI (Controlo Negativo da Sonda)}}$$

A reação positiva é definida pela percentagem de valores positivos para a sonda, que sejam superiores ao valor predefinido de corte para a sonda. A reação negativa é definida como a percentagem de valores positivos inferiores ao valor de corte. No ambiente controlado de CQ do produto, a MFI referente ao controle negativo é tipicamente de 0 a 100 e pode variar entre lotes e produtos específicos ao locus.

Os sinais fora da faixa podem representar controles ineficientes dos parâmetros do ensaio, tais como quantidade da amostra e/ou qualidade da amostra, técnica, calibração do instrumento e estado de todos os reagentes, inclusivamente DNA amplificado, tampões, SAPE e a mistura de microesferas.

2. Comparar a percentagem dos valores positivos calculados com os valores pre-determinados de corte para cada sonda de teste. Atribuir um valor positivo às sondas que têm uma percentagem positiva superior ao valor de corte e um atributo negativos às que estão abaixo do valor de corte. O MFI do controle positivo deve estar entre 1200 e 7000 MFI. (O valor MFI pode estar fora desta faixa [consultar [Valores Esperados](#), Seção C] e varia de acordo com cada sonda de controle positivo e lote.) O MFI de cada sonda é normalizado de acordo com o MFI do controle positivo e é expresso sob a forma de percentagem de MFI do controle positivo. O valor predefinido de corte para cada sonda foi estabelecido utilizando um painel de 100 a 200 amostras de DNA.

B. Análise de dados

1. Determinar o alelo (ou grupos de alelos) de HLA da amostra fazendo corresponder o padrão das IDs das microesferas positivas e negativas com as informações na folha de trabalho do LABType™ SSO ou utilizando o Software HLA Fusion™.

Observação: Para os ensaios LABType™ High Definition e LABType™ que contêm frascos de esferas suplementares, é necessário utilizar o software HLA Fusion™ versão 2.0 ou superior para realizar a análise dos dados.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O sistema LABType™ SSO combina um processo de amplificação de DNA de HLA locus-específico e um processo de hibridação DNA-DNA. O procedimento, bem como a calibração do equipamento descritos neste produto, devem ser estritamente cumpridos.

A amplificação de DNA é um processo dinâmico que requer condições altamente controladas para obtenção de produtos PCR específicos para um segmento alvo de gene(s) HLA. O procedimento fornecido para o processo de amplificação de DNA deve ser estritamente cumprido. Especificamente, uma vez que a quantidade e a qualidade da amostra de DNA podem afetar significativamente a reação de amplificação, recomendamos vivamente a utilização de procedimentos normalizados de extração de DNA e de medição espectrofotométrica da quantidade e qualidade do DNA, seguidos da análise electroforética em gel.

Além disso, para evitar a contaminação dos materiais iniciais com produtos PCR, todos os materiais gerados depois da amplificação de DNA (materiais pós-PCR, incluindo misturas de reação, todos os artigos plásticos descartáveis e o equipamento, como dispositivos de pipetagem e dispositivos de electroforese em gel) têm de ser fisicamente separados dos materiais utilizados antes da amplificação de DNA (materiais pré-PCR, incluindo todos os artigos plásticos descartáveis, dispositivos de pipetagem, amostras de DNA, todos os reagentes utilizados para preparar as reações de amplificação).

Recomenda-se a realização rotineira de testes de esfregaço na área de trabalho de pré-amplificação com um método validado de detecção que esteja em conformidade com as diretrizes fornecidas pelo órgão regulamentador competente.

O ensaio com base na hibridação DNA-DNA utilizando o LABType™ SSO é um processo muito sensível à temperatura. A temperatura usada para o ensaio deve ser verificada (calibrada) com frequência. O cumprimento rigoroso das temperaturas e dos tempos de incubação descritos neste procedimento é de extrema importância para a obtenção de resultados.

As microesferas LABType™ SSO são sensíveis à luz e devem ser protegidas da mesma, tanto quanto possível. Evitar congelar e descongelar para assegurar um prazo de validade máximo.

A mistura de microesferas fornecida contém uma quantidade cuidadosamente otimizada de conjuntos de microesferas que transportam sondas específicas para os alelos HLA. Qualquer alteração da mistura afetará significativamente a precisão do ensaio e invalidará os resultados. Para minimizar a perda de microesferas durante o ensaio, seguir o protocolo descrito aqui e utilizar apenas as pontas de pipetas e os tubos recomendados. A mistura de microesferas fornecida contém uma quantidade cuidadosamente otimizada de conjuntos de microesferas que transportam sondas específicas para os alelos HLA. Qualquer alteração da mistura afetará significativamente a precisão do ensaio e invalidará os resultados.

Quando comparado com o SSP, o SSO apresenta mais ambiguidades porque as sondas utilizadas no SSO têm capacidade para verificar o DNA da amostra em apenas uma região por teste, ao passo que o SSP pode verificar o DNA da amostra em duas regiões por teste. Esta é uma limitação básica do método SSO, que é bem compreendida pelos profissionais de HLA. Tal como mencionado anteriormente, em cada lote dos Testes de Tipagem LABType™ SSO é fornecida uma lista de Limitações de Resolução para ajudar na interpretação do padrão de reação e atribuição da tipagem HLA.

Todos os instrumentos (por exemplo, o termociclador, os dispositivos de pipetagem, o LABScan™ 100 ou LABScan3D™ e o bloco de aquecimento) devem ser calibrados e/ou verificados de acordo com as recomendações do fabricante.

Para obter informações específicas sobre o lote, consultar o documento *Bead Probe Information*.

Devido à complexidade das definições alélicas do HLA, um técnico ou um especialista de HLA certificado deve rever e interpretar os dados e atribuir a tipagem HLA.

Este teste não deve ser usado como única base para tomar uma decisão clínica.

VALORES ESPERADOS

A. Amplificação da amostra

1. Espera-se que a mistura fornecida de primer HLA locus-específico produza uma quantidade adequada de DNA amplificado. A não detecção de um produto de amplificação corado com brometo de etídio por eletroforese em gel invalida os resultados do teste.
2. A amplificação de DNA está sujeita a contaminação por DNA previamente amplificado. A detecção da contaminação (realizando-se uma amplificação de controle com água ou um teste de limpeza de DNA pré-estabelecido para detecção de produtos de amplificação contaminantes) pode invalidar os resultados do teste.

B. Analisador LABScan™ 100 e LABScan3D™

1. O LABScan™ 100 ou LABScan3D™ são analisadores de fluxo avançados que requerem manutenção e calibração e/ou verificação diárias. Consultar o Manual do Utilizador do Luminex® 100/200 ou Luminex® FLEXMAP 3D® para aprender todas as operações de manutenção necessárias. A manutenção diária inclui procedimentos de inicialização e de encerramento de rotina. Para um melhor desempenho, calibrar o instrumento como parte da rotina de inicialização. Calibrar o instrumento sempre que a temperatura **Δ Cal Temp** apresentada no painel do monitor do sistema for superior a ± 3 °C no LABScan 100 ou a ± 5 °C no LABScan 3D.
2. O instrumento tem de passar um teste de calibração antes das amostras do LABType™ SSO serem analisadas.

C. Aquisição de Dados e Análise

Para obter dados válidos, têm de ser controlados dois parâmetros, contagem e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) para cada aquisição de dados. A contagem representa a quantidade total de microesferas que foram analisadas e deve ser superior a $100 \pm 25\%$. Uma redução significativa na contagem sugere que houve perda de esferas durante a aquisição da amostra ou durante o ensaio e pode invalidar os resultados do teste.

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

As informações de CQ do produto no software de análise apresentam valores específicos do lote obtidos utilizando amostras de DNA que cumprem os respetivos requisitos (ver [Colheita e Preparação das Amostras](#)).

Recomenda-se vivamente que os usuários calculem sua própria faixa para o valor de controle utilizando testes de validação de amostras de referência para cada lote. Uma redução ou elevação significativa na MFI para a sonda de controle positivo, acompanhada de padrões de reação não atribuíveis, pode sugerir uma quantidade e/ou qualidade inadequadas da amostra, eficácia reduzida do ensaio ou falha do instrumento e pode invalidar os resultados do teste.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

Nas amostras normais e utilizando condições de ensaio e de aquisição de dados que estejam de acordo com as especificações descritas neste folheto informativo do produto (por exemplo, uma concentração de DNA genômico inicial de 20 ng/μl e de pureza, um OD260/280 de 1,65 a 1,80, condições de temperatura de incubação de hibridação e de lavagem e o estado do desempenho do analisador LABScan™ 100 ou LABScan3D™), as reações positivas e negativas são identificadas por comparação da Intensidade Média de Fluorescência (MFI) relativa de uma amostra com o correspondente valor de corte. O valor de corte foi determinado de forma experimental para um determinado lote de produto LABType™ SSO e o corte é utilizado para se poder distinguir entre os sinais positivos e negativos, com base no genótipo HLA de uma amostra. Espera-se que os resultados demonstrem a presença ou ausência de determinado(s) alelo(s) HLA, fornecendo uma atribuição de tipagem bem definida.

BIBLIOGRAFIA

1. Terasaki, PI, Bernoco, F, Park MS, Ozturk G, Iwaki Y. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and -D antigens. American Journal of Clinical Pathology 69:103-120, 1978.
2. Slater RD, Parham P. Mutually exclusive public epitomes of HLA-A, B, C Molecules. Human Immunology 26: 85-89, 1989.
3. Manual do Utilizador do Luminex 100®, Luminex Corporation, PN 89-00002-00-005 Rev. B.
4. Manual do Utilizador do Hardware do Luminex® FLEXMAP 3D®, Luminex Corporation, PN 89-00002-00-187.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

MARCAS COMERCIAIS E RENÚNCIA DE RESPONSABILIDADES

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

LABType™ é uma marca registada da One Lambda, Inc.

LABScan™ e HLA Fusion™ são marcas comerciais da One Lambda, Inc.

Luminex®, xPONENT® e FLEXMAP® são marcas registadas da Luminex Corporation

Pipetman® é uma marca registada da Rainin Instrument Co., Inc.

Fotodyne® FOTO/UV21 é uma marca registada da FOTODYNE Incorporated

FMC SeaK®em é uma marca registada da FMC Corporation

Amplitaq™ é uma marca comercial da Roche Molecular Biochemicals

REPRESENTANTE BRASILEIRO AUTORIZADO

BIOMETRIX DIAGNÓSTICA LTDA.

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

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

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

CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

One Lambda, Inc.
22801 Roscoe Blvd
West Hills – CA – EUA
REGISTRO ANVISA
80298490005

Resumo do protocolo do ensaio de 96 amostras

A. Pré-configuração

1. Ligar o analisador LABScan™ 100 ou LABScan™ 3D e dar início ao procedimento de arranque. Ligar o termociclador e iniciar o programa de incubação a 60 °C.
2. Preparar um banho de gelo moído (acrescentar uma pequena quantidade de água para que a placa PCR fique direita sobre o gelo)
3. Descongelar e submeter o D-Mix e o DNA ao agitador vortex.
4. Retirar todos os reagentes (excepto o frasco de 100X SAPE) do armazenamento e deixá-los atingir a temperatura ambiente.
5. Misturar bem todo o volume do Tampão de Hibridação e toda a Mistura de esferas num tubo limpo; proteger da luz.

B. Amplificação

1. Descongelar todos os reagentes de amplificação e colocar no gelo.
2. Aliquotar 2 µl de DNA genômico em cada um dos 96 poços, numa placa PCR.
3. Misturar 432 µl de Mistura de Primer, 1491 µl de D-Mix e 22 µl de polimerase Taq. Submeter ao agitador vortex rapidamente.
Nota: o cálculo é gerado para 108 amostrar para evitar faltas.
4. Aliquotar 18 µl de Mistura de Amplificação do Passo 3 em todos os 96 poços que contêm DNA.
5. Tampar ou vedar a placa PCR.
6. Colocar a placa em um termociclador utilizando o programa PCR LABType™ SSO.
7. Retirar a placa PCR do termociclador e verificar o DNA amplificado em um gel de agarose a 2,5% (utilizar 5 µl por poço).

C. Desnaturação/Neutralização

1. Numa placa PCR limpa com 96 poços de paredes finas, aliquotar 2,5 µl de Tampão de Desnaturação por poço.
2. Acrescentar 5 µl de DNA amplificado por poço. Tomar nota das localizações das amostras nos 96 poços.

NOTA: O DNA amplificado pode ser aliquotado primeiro, com o acréscimo posterior de Tampão de Desnaturação.

3. Misturar bem até a mistura ficar cor-de-rosa claro.
4. Incubar à temperatura ambiente (entre 20° e 25° C) durante 10 minutos.
5. Acrescentar 5 µl de Tampão de Neutralização por poço.
6. Misturar bem até a mistura ficar transparente ou amarelo claro.
7. Colocar cuidadosamente a placa no banho de gelo.











D. Hibridação/Lavagem

1. Aliquotar 38 µl da Mistura de Hibridação (do ponto A.5 acima) por poço em todo o DNA neutralizado.
2. Colocar na placa uma película para selagem de placas e submeter ao agitador vortex misturando muito bem a baixa velocidade.
3. Incubar a placa num bloco de 96 poços em um termociclador a 60° C (utilizar a almofada emborrachada PCR) durante 15 minutos.
4. Retirar a placa. Acrescentar 100 µl de Tampão de Lavagem a cada poço. Colocar na placa uma película para selagem de placas nova e submeter ao agitador vortex misturando a 1 000 g durante 5 minutos.
5. Retirar o sobrenadante, deixando aproximadamente 10 µl ou menos.
6. Repetir os Passos D.4 e D.5 mais duas vezes fazendo um total de 3 lavagens.
7. Durante o último passo de centrifugação, preparar 1X SAPE (57,5 µl de Stock e 5693 µl de Tampão SAPE) e deixar fechado à temperatura ambiente.

E. Marcação

1. Depois de remover o sobrenadante da terceira lavagem (D.6, acima), acrescentar 50 µl de 1X SAPE por poço.
2. Colocar cuidadosamente na placa uma película para selagem de placas e submeter ao agitador vortex misturando muito bem a baixa velocidade.
3. Incubar a 60° C no termociclador durante 5 minutos, tal como indicado em cima.
4. Retirar a placa e acrescentar 100 µl de Tampão de Lavagem a cada poço. Colocar na placa uma película para selagem de placas nova e submeter ao agitador vortex misturando a 1 000 g durante 5 minutos.
5. Remover o sobrenadante. Acrescentar Tampão de Lavagem até obter um volume final de 80 µl.
6. Misturar por pipetagem e transferir todas as amostras para uma microplaca de 96 poços para aquisição de dados.

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
	Número de Catálogo
	Aparelho médico de diagnóstico in-vitro
	Consultar as instruções de utilização
	Aviso, consultar os documentos inclusos
	Riscos biológicos
	Limitação de temperatura
	Marca CE
	Marca CE de qualidade médica
	Fabricante
	Representante autorizado na Comunidade Europeia

HISTÓRICO DE REVISÕES

Revisão	Data	Descrição da Revisão
01	04/08/2019	Sistema de Controlo de Documentos Internos Atualizado. Sem alterações ao conteúdo do documento.
02	09/21/2019	Informações e morada de contacto atualizados para refletir a alteração no local legal de fabrico.
03	Em vigor	Modificar a designação do software xPONENT para abranger a versão atual e futura do software
04	31/05/2022	Revisão gramatical



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