



Instruções de utilização de Biofortuna SSPGo™ HLA Typing Kits Versão 4. Junho 2011.

1. Finalidade de uso

Os kits Biofortuna HLA SSPGo são kits qualitativos à base de ADN para a determinação de alelos do HLA em kits de “elevada resolução” ou para a amplificação grupo-específica de alelos em kits de resolução de “nível médio”. A resolução de nível médio é normalmente definida como a resolução em que a maioria dos resultados são claramente definidos ao nível dos dois dígitos; p. ex. DQB1*02, DQB1*05, etc. A elevada resolução é geralmente definida como a maioria dos alelos ao nível do quarto dígito tais como DQB1*02:01, DQB1*05:01, etc. Este produto destina-se a ser utilizado em diagnóstico *in vitro* apenas por pessoal devidamente treinado para o efeito.

2. Introdução

As moléculas do HLA desempenham um papel fundamental na imunidade e no reconhecimento do próprio versus o não-próprio, conseqüentemente a genotipagem do HLA e a determinação da compatibilidade do HLA é obrigatória antes da maior parte dos tipos de transplantes. Como os antígenos HLA restringem a especificidade das respostas imunitárias mediadas pelas células-T, a genotipagem do HLA é uma ferramenta útil na investigação de doenças imunitárias e de respostas imunitárias a patógenos, vacinas ou tratamento clínico. A genotipagem do HLA também pode ser utilizada como meio auxiliar no diagnóstico de doenças em que foi demonstrada uma ligação significativa de determinados alelos do HLA à doença.

A maior parte dos genes do HLA são altamente polimórficos e geralmente é necessária a genotipagem do ADN para a determinação exacta dos antígenos do HLA. A genotipagem por PCR utilizando *primers* específicos de sequências (SSP - *Sequence-Specific Primers*)¹ é um método rápido de genotipagem do HLA, particularmente adequado para situações em que é necessária uma resolução de nível médio. Todos os kits Biofortuna SSP incluem reacções secas completas, incluindo polimerase, o que significa que a única coisa que o utilizador precisa de fazer antes da PCR é adicionar ADN.

São feitos todos os esforços para manter estes kits actualizados com os dados de alinhamento do HLA disponibilizados pelo IMGT. As actualizações dos kits estão disponíveis em www.biofortuna.com.

3. Descrição do teste

A técnica PCR SSP é baseada no princípio de que só serão amplificados os *primers* com terminais 3' totalmente compatíveis com uma sequência alvo. Os *primers* não compatíveis não originam produtos de amplificação positivos². Em todas as misturas de reacção PCR está incluído um par de *primers* de controlo interno, que amplifica uma região conservada de um gene *housekeeping*; o par de *primers* de controlo interno é um indicador da integridade da reacção PCR. A genotipagem SSP utiliza geralmente reacções múltiplas que, quando analisadas em conjunto, indicam

o genótipo. A visualização dos produtos amplificados pode ser conseguida utilizando sistemas de electroforese em gel de agarose que separam os fragmentos de ADN por tamanho.

4. Conteúdo do kit

- 10-40x placas ou tiras de polipropileno para PCR com 1 - 96 cuvetes PCR (dependendo do kit), cada cuvete contém 10 µl de *primers*, polimerase, dNTPs* e tampão liofilizados, pré-dispensados. Cada teste ou tira é embalado individualmente numa bolsa de alumínio.
- 1x Instruções de utilização.
- Tabelas de interpretação, fichas de segurança dos materiais e certificados de análise estão disponíveis no sítio da Biofortuna www.biofortuna.com. Se tiver problemas em aceder a estes documentos, por favor contactar o seu distribuidor local.

*Trilink Biotechnologies Inc licenciou a utilização de CleanAmp™ dNTPs com os produtos Biofortuna SSPGo.

5. Reagentes e equipamentos não fornecidos

- Pipetas e pontas de pipetas apropriadas, p. ex. Pipeta P10 com pontas com filtro de 10 µl.
- Kit/equipamento de isolamento de ADN.
- Espectrofotómetro de UV.
- Tubos de polipropileno.
- Água esterilizada para utilização em biologia molecular.
- Tampas ou folhas selantes para PCR. (Nos kits com tiras de tubos são fornecidas tampas)
- Termociclador de 96 poços com tampa aquecida. As placas e tubos para PCR utilizados nos kits Biofortuna foram validados para utilização com a maioria dos termocicladores disponíveis no mercado, incluindo os seguintes: MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS e Techne TC-512. Modelos diferentes poderão ter de ser validados pelo utilizador.
- Reagentes de electroforese em gel (agarose, TBE 0,5x, marcador de peso molecular de ADN de 1000 pb, 10 mg/ml de brometo de etídio).
- Equipamento de electroforese em gel (tinhas de gel, fonte de alimentação, sistema de documentação do gel com transiluminador de UV).

6. Avisos e segurança

- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Os testes só devem ser realizados por pessoal devidamente treinado para o efeito.
- Todos os resultados de tipagem devem ser verificados por pessoal qualificado e, se forem utilizados na tomada de decisões clínicas, os resultados devem ser confirmados utilizando outro método de tipagem.
- Todos os reagentes devem ser manuseados de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Manter as zonas de pré- e pós-PCR separadas. Os materiais da zona pós-PCR não podem ser levados para a zona de pré-PCR.
- **Aviso de perigo biológico:** manusear todos os produtos sanguíneos como potencialmente infecciosos.
- **Aviso de perigo biológico:** o brometo de etídio é um potencial carcinogéneo. Se for utilizado, devem utilizar-se sempre luvas, bata de laboratório e protecção ocular.
- **Aviso de perigo biológico:** tomar as devidas precauções ao utilizar fontes de luz UV - utilizar sempre luvas, bata de laboratório e protecção ocular. Nunca olhar directamente para a fonte de luz UV.
- As fichas de segurança dos materiais estão disponíveis em www.biofortuna.com.

7. Conservação e estabilidade

Os kits Biofortuna SSPGo devem ser conservados entre 4 a 30°C. Depois das cuvetes PCR serem retiradas das bolsas de alumínio os reagentes devem ser rehidratados com ADN no prazo de 3 horas. Consultar o prazo de validade na embalagem. Não utilizar os produtos após a data impressa.

Se a bolsa de alumínio estiver rasgada ou perfurada não utilizar os kits.

Assegurar que as cuvetes para PCR estão bem seladas após a adição do ADN para evitar a evaporação durante a amplificação PCR. Tomar especial atenção às extremidades e aos cantos.

8. Instruções de utilização

Requisitos da amostra de ADN

Cada reacção no teste está optimizada para utilizar entre 50 - 100 ng de ADN, mas é muito importante que cada reacção seja rehidratada com exactamente 10 µl de líquido. Portanto, o teste pode ser efectuado com 10 µl de ADN a 5-10 ng/µl ou pode ser primeiro adicionado um volume de água para permitir a adição do ADN numa concentração mais elevada, p. ex. adicionando 9 µl de água seguidos de 1 µl de ADN a 50-100 ng/µl. Como a heparina pode inibir a PCR, recomenda-se que o ADN não seja extraído de amostras de sangue heparinizadas. A $DO_{260/280}$ da amostra de ADN medida através de espectrofotometria de UV deve situar-se entre 1,6 e 2.

Instruções pré-PCR

- i. Retirar uma placa ou tira SSPGo de uma bolsa selada.
- ii. Anote o número de lote, o número do produto e a versão do(s) ensaio(s).
- iii. A primeira reacção de cada *locus* de teste é sempre de cor vermelha.
- iv. Algumas placas de PCR contêm uma reacção “no template control” (controlo negativo) integral de cor púrpura no último poço da placa.
- v. Utilizando equipamento esterilizado pipetar 10 µl de solução de ADN para cada reacção da placa ou tira. Consultar a nota na secção 8, Requisitos da amostra de ADN. Se a placa tiver o “no template control” integral de cor púrpura, pipetar para o mesmo 10 µl de diluente da amostra (sem ADN). Consultar a nota sobre “No Template Control” na secção 8.
- vi. Assegurar que o ADN entra em contacto com os reagentes secos em cada reacção antes de se submeterem ao termociclador. Pode ser utilizado um passo de centrifugação breve para assegurar que toda a solução de ADN entra em contacto com os reagentes secos.
- vii. Selar as reacções com uma folha selante ou tampas para tubos PCR. Assegurar que o selante está bem colocado para evitar evaporação. Tomar especial atenção às extremidades e aos cantos.
- viii. Colocar a placa ou as tiras directamente no termociclador. Assegurar que as cuvetes estão completamente inseridas no bloco e que a tampa está totalmente comprimida. Caso contrário, poderá verificar-se falha individual da PCR. Com alguns modelos de aparelhos PCR poderá ser necessário utilizar blocos de compressão para obter uma compressão eficaz do produto no bloco.
- ix. Efectue o programa PCR (consultar Parâmetros PCR).

NOTA SOBRE RESSUSPENSÃO: assegurar que as misturas de PCR são ressuspensas com a amostra de ADN no prazo de 3 horas após a placa ser retirada da bolsa de alumínio.

NOTA SOBRE O “NO TEMPLATE CONTROL”: alguns kits incluem um “no template control” (NTC) como reacção final na placa. Esta reacção contém um corante púrpura para a distinguir do resto das reacções e a sua presença no kit também é mencionada nas tabelas de interpretação. O NTC está concebido para detectar contaminação PCR ou contaminação de ADN genómico de kits Biofortuna SSPGo que pode estar presente na água utilizada para ressuspender o ADN. Se houver contaminação PCR serão observados produtos amplificados de tamanho variável, se houver contaminação com ADN genómico será observado um produto amplificado de 187 pb.

NOTA SOBRE PERFIL DE ALTURA DA PLACA/TIRA PCR: recomenda-se que o perfil de altura das placas e tiras seja equivalente quando estas são colocadas no mesmo aparelho PCR. Perfis de altura diferentes podem originar mau contacto com a tampa aquecida dos aparelhos PCR. Isto pode dar origem a uma amplificação PCR falhada ou fraca.

Parâmetros PCR

Devem ser utilizados os seguintes parâmetros PCR. Assegurar velocidades de rampa de 1°C por segundo, no mínimo, e activar a tampa aquecida. Para obter instruções de utilização completas, consultar o manual de utilização do fabricante do termociclador. Os termocicladores devem ser calibrados de acordo com as regras de acreditação da American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) ou da European Federation of Immunogenetics (EFI).

Desnaturar	94°C	5 minutos		
Desnaturar	96°C	15 segundos	←	10 ciclos
Hibridar	66°C	50 segundos		
Extensão	72°C	30 segundos		
Desnaturar	96°C	15 segundos	←	20 ciclos
Hibridar	64°C	50 segundos		
Extensão	72°C	30 segundos		
HOLD	15°C			

Electroforese em gel

Estas instruções aplicam-se à electroforese horizontal em gel de agarose: preparar um gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5x. Quando o gel tiver arrefecido e tiver atingido uma temperatura de aproximadamente 60°C adicionar brometo de etídio para obter uma concentração final de 0,5 µg/ml. Moldar o gel e inserir pentes de formato de microtitulação (p. ex. 12x8 poços com espaçamento de 9 mm). Quando o gel estiver consistente, retirar os pentes e cobrir o gel em tampão TBE 0,5x. Transferir um mínimo de 5 µl e um máximo de 10 µl de cada reacção da placa ou tira para o poço correspondente no gel, anotando a posição de cada reacção. Uma escala de 100 pb pode ser utilizada para ajudar a determinar o tamanho. Submeter o gel a 10 V/cm durante 20 minutos.

Para obter informações detalhadas sobre o equipamento, consultar as instruções de utilização do fabricante do sistema de electroforese. Os géis devem ser visualizados utilizando um sistema de documentação de gel UV com um transiluminador de UV.

9. Interpretação

Os kits SSPGo são concebidos para que os resultados possam ser determinados manualmente utilizando tabelas de interpretação disponíveis em www.biofortuna.com. Se tiver problemas em aceder ao sítio da internet, por favor contactar o seu distribuidor local.

Afixar a fotografia do gel ao formulário de interpretação correspondente, fazendo corresponder o número do kit e da versão. Examinar a imagem do gel. Cada reacção deve conter uma banda de controlo positivo. Consultar as tabelas de interpretação já que esta pode ter um tamanho diferente em diferentes produtos SSPGo. As bandas de controlo interno podem aparecer muito mais fracas quando estão presentes bandas específicas de alelos. Se estiver presente uma banda específica de um alelo, mas não uma banda de controlo, o resultado deve, ainda assim, ser considerado positivo. Bandas inferiores a 70 pb devem ser ignoradas porque são *primers* não incorporados.

Determinar as reacções positivas. As reacções positivas são indicadas por bandas do tamanho esperado, tal como indicado nas tabelas de interpretação. Ter em atenção que pode haver mais de um tamanho de produto numa dada reacção – estas são reacções multiplex e estão assinaladas nas tabelas de interpretação.

Comparar as reacções positivas com as tabelas de interpretação. Um resultado positivo numa reacção indica a presença de pelo menos um dos alelos indicados na tabela de interpretação. Um determinado alelo pode ser amplificado em vários tubos – se o alelo estiver presente deverá ocorrer uma reacção positiva em todas as reacções relevantes.

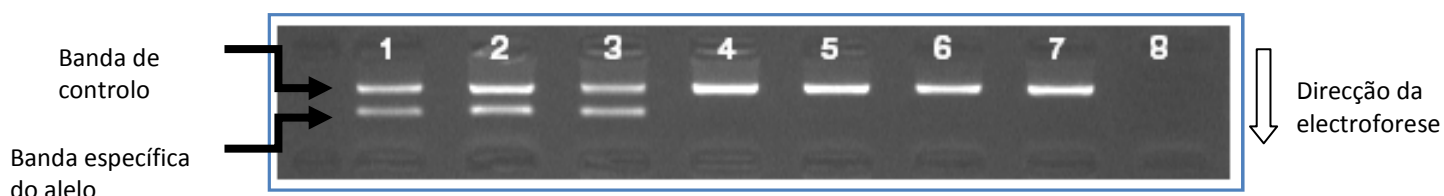


Fig. 1 Exemplos de reacções positivas, indicadas pela presença de bandas específicas de alelos e bandas de controlo (reacções 1-3); reacções negativas, indicadas pela presença de bandas de controlo mas ausência de bandas específicas de alelos (reacções 4-7); e uma reacção falhada, indicada pela ausência de quaisquer bandas (reacção 8).

Assegurar que a versão do kit corresponde à versão na tabela de interpretação.

10. Garantia e controlo de qualidade

Todos os lotes de SSPGo são submetidos a uma verificação de qualidade antes da sua introdução no mercado. Amostras de cada lote de kits são verificadas com base num painel de amostras de ADN humano para assegurar um desempenho correcto. Cada reacção foi validada com base em pelo menos 48 amostras de linhas celulares de ADN bem caracterizadas. A Biofortuna recomenda que qualquer laboratório valide internamente quaisquer novos produtos de tipagem antes da sua utilização em amostras clínicas. A tipagem para efeitos de diagnóstico só deve ser realizada por pessoal qualificado e treinado e os resultados devem ser confirmados por outro elemento treinado do pessoal.

11. Referências

- 1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
- 2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

12. Legenda dos símbolos utilizados

	Número de testes
	Representante CE
	Consultar as instruções de utilização
	Local de fabrico
	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Prazo de validade
	Temperatura de conservação
	Número de lote

13. Fabricante

Biofortuna Ltd
 1 Hawkshead Road
 Croft Business Park
 Bromborough, CH62 3RJ, UK
 T: +44 (0) 151 334 0182
 E: info@biofortuna.com
 W: www.biofortuna.com



14. Traduções

Française:	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
České:	Překlady k dispozici
Danske:	Tilgængelige oversættelser
Έλληνες:	διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítások
Norske:	Oversettelser tilgjengelig
Polska:	Dostępne tłumaczenia
Português:	Traduções disponíveis
Россию:	Переводы доступны
Slovenskému:	Překlady k dispozici
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

15. Guia de resolução de problemas SSPGo

Problema	Causa provável	Solução
Ausência de amplificação nas reacções	Foi utilizada uma concentração incorrecta de ADN	Medir a quantidade de ADN e assegurar que no total são adicionados 50 - 100 ng de ADN a um volume de 10 µl, por reacção.
	Inibidores da PCR presentes na amostra de ADN	Evitar a utilização de sangue heparinizado ou, se tal não for possível, extrair o ADN de linfócitos intactos lavados de modo a que a heparina não entre em contacto com o ADN. Foram descritos protocolos que utilizam heparinase para remover a heparina de amostras de ADN. Voltar a extrair o ADN. Consultar as instruções de utilização do fabricante do kit de extracção de ADN.
	Foi utilizada uma amostra de ADN de fraca qualidade	Medir a qualidade do ADN. O rácio A260/A280 deve ser de 1,6 – 2,0 através de espectrofotometria de UV. Assegurar que o ADN está totalmente ressuspensão na solução antes de utilizar.
	Os reagentes não estão totalmente ressuspensos	Assegurar que as pastilhas ficam totalmente rehidratadas quando se adiciona o ADN. Se necessário, centrifugar a placa brevemente. Assegurar que são utilizados 10 µl de solução de ADN por reacção.
	O termociclador não foi devidamente configurado	Assegurar que o programa PCR foi introduzido correctamente, de acordo com as instruções de utilização. Assegurar que a tampa aquecida do termociclador está activada e que está suficientemente apertada. Para mais informações consultar as instruções de utilização do termociclador.
	Problemas com a electroforese	Assegurar que a tina de electroforese tem energia eléctrica – verificar a fonte de alimentação e limpar os eléctrodos. Colocar o gel em tampão TBE 0,5X. Assegurar que são utilizados 0,5 µg/ml de brometo de etídio fresco. Ao visualizar o gel, assegurar que a iluminação UV é suficiente. Para mais informações consultar as instruções de utilização fornecidas pelo fabricante da tina de gel e da fonte de alimentação.
	As placas não foram devidamente seladas.	Placas seladas incorrectamente podem dar origem a evaporação durante a PCR. A Biofortuna fornece folhas

Problema	Causa provável	Solução
		<p>de selagem recomendadas (produto número BF-40-11).</p> <p>Assegurar que todos os poços estão devidamente selados. Tomar especial atenção aos poços situados próximo das extremidades da placa ou tira de PCR.</p>
Saídas aleatórias de controlo e/ou produtos amplificados específicos de alelos.	Erros no gel	<p>Assegurar que todos os poços foram colocados no gel pela ordem correcta e que foi adicionado a cada um o mesmo volume de reacção de PCR.</p> <p>Calibrar as pipetas conforme descrito nas instruções de utilização do fabricante.</p> <p>Verificar se os poços estão devidamente formados no gel.</p> <p>Remover os pentes com cuidado para não rasgar o fundo dos poços.</p> <p>Assegurar que a agarose está totalmente dissolvida antes de moldar o gel.</p> <p>Assegurar que o gel não é submetido à corrente eléctrica durante demasiado tempo, já que os produtos amplificados de menor dimensão podem sair pela extremidade.</p> <p>Assegurar que o gel é submetido à corrente eléctrica durante tempo suficiente para permitir que as bandas se separem.</p> <p>Utilizar solução de brometo de etídio nova.</p>
	Problemas com o termociclador	<p>Falhas, em particular em redor da extremidade do ensaio, podem dever-se ao facto de a tampa não estar suficientemente apertada. Isto pode dar origem a evaporação e a condensação da reacção PCR a meio da cuvete PCR e pode originar falha da PCR.</p> <p>Seguir as instruções de manutenção e de calibração do fabricante do termociclador.</p> <p>Verificar se os parâmetros PCR estão correctos, de acordo com as instruções de utilização.</p>
	Problemas de evaporação	<p>Assegurar que todos os poços estão devidamente selados. Tomar especial atenção aos poços situados próximo das extremidades da placa ou tiras de PCR.</p> <p>Assegurar que a tampa aquecida está activada e é aplicada compressão suficiente através da tampa. A Biofortuna fornece folhas de selagem recomendadas (produto número BF-40-11).</p>
	Falha esporádica devido a problemas de ADN	Sem ADN presente: assegurar que todos os poços têm ADN.

Problema	Causa provável	Solução
		<p>Volume incorrecto: assegurar que são adicionados 10 µl de solução de ADN por reacção.</p> <p>Demasiado ADN adicionado: concentração superior a 200 ng pode originar falha da PCR.</p> <p>Contaminação do ADN pode dar origem a uma falha de amplificação esporádica ou generalizada.</p>
Imagem do gel com manchas	ADN	Verificar a concentração e a pureza do ADN. A adição de demasiado ADN às reacções PCR pode dar origem a imagens com manchas no gel.
Amplificação fraca.	Problema na concentração de ADN	Assegurar que a concentração de ADN não é demasiado baixa nem demasiado alta. Tentar atingir uma concentração de 100 ng de ADN por reacção, em 10 µl.
	Problemas com o termociclador	<p>Seguir as instruções de manutenção e de calibração do fabricante do termociclador.</p> <p>Verificar se os parâmetros PCR estão correctos, de acordo com as instruções de utilização.</p>
	Erros no gel	<p>Assegurar que foi adicionado o mesmo volume de reacção a cada poço, entre 5 µl e 10 µl.</p> <p>Calibrar as pipetas conforme descrito nas instruções de utilização do fabricante.</p> <p>Utilizar solução de brometo de etídio nova.</p>
Amplificação não específica	Problema na concentração de ADN	Assegurar que a concentração de ADN não é demasiado baixa nem demasiado alta. Tentar atingir uma concentração de 50 - 100 ng de ADN por reacção, em 10 µl.
	Reacções colocadas pela ordem incorrecta	<p>Verificar o alinhamento das faixas do gel e da PCR.</p> <p>Evitar o transbordamento físico dos poços adjacentes na electroforese, não sobrecarregando e assegurando que o gel está consistente antes de remover os pentes.</p>
	Novo alelo identificado	Alelos previamente não sequenciados podem estar presentes com um novo padrão de amplificação. Se estiver a utilização folhas de interpretação antigas, descarregue uma actualização de alinhamento mais recente do sítio www.biofortuna.com . Se isto não acomodar o novo padrão, deve utilizar um kit Biofortuna diferente ou deve tentar identificar a sequência através da tipagem de sequências. Em alternativa, contactar a assistência técnica Biofortuna para obter assistência adicional.
O padrão de amplificação não é interpretável	Artefacto incorrectamente interpretado como uma banda específica	Consultar as Tabelas de Interpretação específicas da versão para saber qual o tamanho correcto da banda.

Problema	Causa provável	Solução
		Verificar se todas as amplificações específicas têm o tamanho correcto ou se um artefacto (contaminação, <i>primer dimer</i>) foi incorrectamente interpretado como uma amplificação.
	Reacções colocadas pela ordem incorrecta	Verificar o alinhamento das faixas do gel e da PCR.
	Falha individual da PCR	Verificar que todos os controlos positivos internos estão presentes. Voltar a interpretar sem reacções em falta.
	Ausência de produtos amplificados de pequena dimensão	A electroforese foi demasiado prolongada, os produtos amplificados de pequena dimensão saíram pela extremidade do gel ou através do brometo de etídio ou dispersaram-se, entrando no poço de gel anterior. Utilizar condições de electroforese adequadas para o seu sistema de gel.
	Novo alelo identificado na amostra	Podem ser descobertos ocasionalmente novos alelos, podendo originar um padrão de amplificação que não corresponde a alelo(s) existente(s). Por favor contactar o seu distribuidor local.