



Instruções de utilização de Biofortuna SSPGo™ HLA Wipe Test BF-40-01

Versão 2

Setembro 2011

1. Finalidade de uso

O Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test destina-se à monitorização de contaminação por produto amplificado PCR que possa ser gerado pelos produtos Biofortuna SSPGo nas zonas e equipamento do laboratório.

2. Introdução

A PCR é uma técnica sensível, susceptível à contaminação com produto amplificado de ADN de uma PCR anterior. A contaminação pode conduzir a uma amplificação falsa positiva nas PCRs subsequentes, podendo gerar uma genotipagem incorrecta. O produto amplificado PCR pode contaminar reagentes e amostras, bem como equipamento laboratorial, como por exemplo, as pipetas. Deve-se verificar regularmente se os reagentes e o equipamento apresentam sinais de contaminação.

3. Descrição do teste

Cada SSPGo HLA Wipe Test é constituído por uma tira de oito poços PCR contendo tampão PCR liofilizado, polimerase e *primers* específicos para o gene HLA-DRA e irá produzir um produto amplificado de 187 pb a partir de ADN de genoma humano. Dado que todos os kits Biofortuna utilizam um produto amplificado de DRA como controlo interno, qualquer contaminação provocada pela utilização dos kits Biofortuna SSPGo terá uma amplificação do gene DRA e será detectada pelos *primers* dos testes de limpeza.

Cada tira de oito poços verifica a contaminação em até três zonas de teste de limpeza. Cada tira tem reacções integrais de controlo positivo e negativo, bem como reacções de controlo da inibição para cada zona de teste de limpeza. Para testar uma zona relativamente a contaminação, é necessário esfregá-la primeiro com uma zaragatoa, que a seguir é embebida em água. Esta água é utilizada como modelo no teste de limpeza, e como uma mistura de 50:50 com ADN genómico como teste de inibição da PCR.

Recomenda-se a execução regular de testes de detecção de contaminação. As zonas habituais a serem testadas incluem a zona de preparação do ADN, zona de execução da PCR e zona pós-amplificação. Os objectos habituais a serem testados incluem bancadas, pipetas, centrífugas, frigorífico e respectivo puxador, puxadores de portas e suportes. As soluções habituais a serem testadas incluem os tampões de preparação de ADN e os diluentes de ADN. Os reagentes multi-usos partilhados, tais como, tampões PCR e polimerase *Taq* são particularmente susceptíveis a contaminação, mas estes não afectam os kits Biofortuna uma vez que os produtos Biofortuna são fornecidos prontos a utilizar e apenas necessitam da adição de ADN.

4. Conteúdo do kit

- 12 Tiras de 8 poços PCR, cada uma contendo 10 µl de *primers* liofilizados pré-dispensados, polimerase, dNTPs* e tampão. Cada tira da bolsa de alumínio destina-se à detecção de contaminação de três zonas. O formato da tira de oito poços de reacção é apresentado abaixo.

Reacção	Corante	Utilização
1	Vermelho	Controlo positivo: ADN
2	Roxo	Controlo negativo: água utilizada para humedecer a zaragatoa
3	Azul	Teste de inibição - Zona 1: 50% de ADN, 50% de água de limpeza
4	Roxo	Teste de limpeza - Zona 1
5	Azul	Teste de inibição - Zona 2: 50% de ADN, 50% de água de limpeza
6	Roxo	Teste de limpeza - Zona 2
7	Azul	Teste de inibição - Zona 3: 50% de ADN, 50% de água de limpeza
8	Roxo	Teste de limpeza - Zona 3

- 36 zaragatoas estéreis
- 12x8 tampas PCR
- 1x Instruções de utilização.
- 1x Certificado de análise
- As fichas de segurança dos materiais (MSDS) podem ser transferidas da página da Internet 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 SSP Go.



5. Reagentes e equipamentos não fornecidos

- Pipetas e pontas de pipetas esterilizadas apropriadas, p. ex. Pipeta P10 com pontas com filtro de 10 µl.
- ADN de genoma humano a 5-10 ng/µl para utilização como controlo positivo.
- Kit/equipamento de isolamento de ADN.
- Espectrofotómetro de UV.
- Tubos de polipropileno de 2 ml.
- Água ultrapura para utilização em biologia molecular.
- 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 (tinas de gel, fonte de alimentação, sistema de documentação do gel com transiluminador de UV).

6. Avisos e segurança

- Os testes só devem ser realizados por pessoal devidamente treinado para o efeito.
- 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 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.

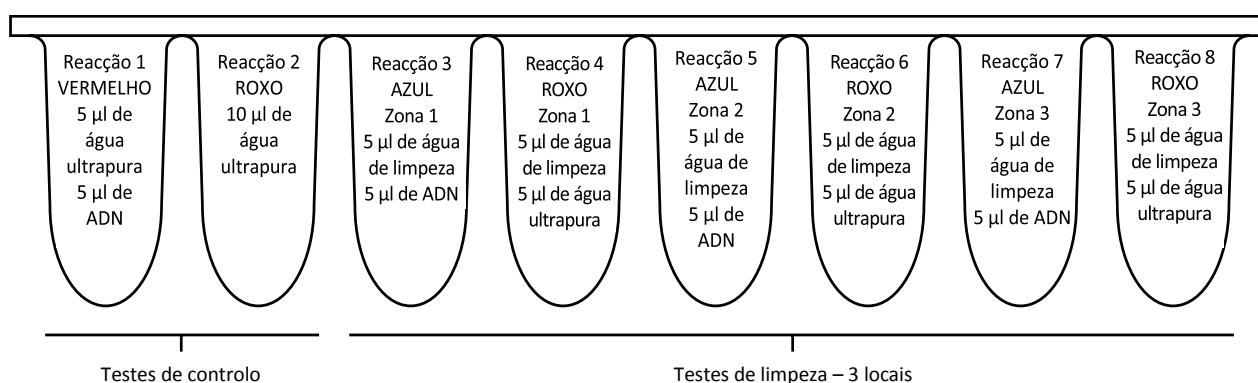
8. Instruções de utilização

Nota:

As pipetas de PCR são uma fonte de contaminação frequente e recomenda-se limpar a ponta da pipeta e, se possível o interior, com uma zaragatoa. Recomenda-se ainda que todos os testes de contaminação sejam efectuados com uma pipeta que tenha sido testada e não tenha apresentado contaminação. Se for detectada contaminação, siga as directrizes do laboratório para a erradicação da contaminação e volte a testar essas zonas.

1. Num local isento de ADN, coloque um rótulo num tubo de polipropileno de 2 ml esterilizado isento de DNase para cada uma das zonas de teste de limpeza a ser testada. Coloque um rótulo num outro tubo com a indicação "Controlo negativo"
2. Utilizando uma pipeta não-contaminada, adicione 500 µl de água destilada ultrapura para utilização em biologia molecular a cada tubo de 2 ml.
3. Humedeça a zaragatoa estéril fornecida em cada tubo de teste de limpeza.
4. Limpe a zona a ser testada com a zaragatoa humedecida.
5. Parta ou corte a haste de plástico da zaragatoa e coloque-a no tubo de água de 2 ml original.
6. Submeta ao vortex durante alguns instantes.
7. Retire e elimine a zaragatoa utilizando pinças esterilizadas.
8. Centrifugue durante 1 minuto a 10.000 - 13.000 rpm numa microcentrífuga e elimine as partículas em suspensão.
9. Abra a bolsa de alumínio do teste. Todos os testes devem ser rehidratados com um volume máximo de líquido de 10 µl, conforme indicado no diagrama 1.
10. **Controlo negativo:** Adicione **10 µl** de água ultrapura para utilização em biologia molecular à reacção **2** do controlo negativo (roxo).
11. Adicione **5 µl** de água ultrapura às reacções **1, 4, 6, 8**.
12. **Controlo positivo:** Adicione **5 µl** de 10 ng/µl de ADN de genoma humano à reacção **1** (reacção vermelha) e às reacções **3, 5 e 7** (azuis).
13. **Reacções dos testes de limpeza:** Adicione **5 µl** de líquido centrifugado (água de limpeza) da zona de limpeza 1 às reacções **3 e 4**, da zona de limpeza 2 às reacções **5 e 6** e da zona de limpeza 3 às reacções **7 e 8**.
14. Todas as reacções têm agora um volume rehidratado de 10 µl, conforme indicado no diagrama 1. Tape as reacções com as tampas fornecidas e prossiga com os parâmetros PCR SSPGo habituais, conforme indicado abaixo.

Diagrama 1.



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

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 resultados dos testes das zonas testadas só são válidos se o controlo positivo for positivo e se o controlo negativo for negativo.

Os testes das zonas testadas só são válidos se o teste de controlo da inibição correspondente for positivo.

Deve ser observado um produto amplificado de 187 pb se existir contaminação PCR ou contaminação com ADN. Manchas ou bandas de tamanho diferente também podem indicar contaminação PCR, mas o *primer-dimer* e outros artefactos de extensão do *primer* inferiores a 100 pb devem ser ignorados.

Reacção	Corante	Utilizar	Resultado	Conclusão	Medida
1	Vermelho	Controlo positivo	187 pb positivo	Teste válido. ADN apropriado. PCR eficaz	
			Nenhuma amplificação	Teste inválido	Repetir todo o ensaio com um controlo de ADN diferente
2	Roxo	Controlo negativo	187 pb positivo	Teste inválido. Água e/ou pipeta contaminada	Testar com outra água e outra pipeta
			Nenhuma amplificação	Teste válido. Água não contaminada	
3, 5, 7	Azul	Teste de inibição	187 pb positivo	Teste de limpeza válido. Nenhum inibidor presente	
			Nenhuma amplificação	Teste de limpeza inválido. Potenciais inibidores presentes	Limpe a zona com água ultrapura e repita
4, 6, 8	Roxo	Teste de limpeza	187 pb positivo	Contaminação presente	Isole e limpe a pipeta utilizada. Limpe a zona contaminada com a solução apropriada para a eliminação de ADN. Repita o teste.
			Nenhuma amplificação	Teste de limpeza negativo. Nenhuma contaminação	

10. Garantia e controlo de qualidade

Testes do ensaio: o produto amplificado PCR de um kit Biofortuna foi deixado a secar numa superfície sólida. O teste de limpeza foi efectuado no produto amplificado não-diluído e, em seguida, em diluições de 1×10^1 a 1×10^{15} . O produto amplificado foi detectado em diluições inferiores ou iguais a 1×10^{15} .

O ADN genómico foi deixado secar numa superfície sólida. O teste de limpeza foi efectuado em gADN a 100 ng/ μ l e, em seguida, em diluições de 1×10^1 a 1×10^{15} . O ADN foi detectado em diluições até 1×10^3 .

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. Biofortuna HLA Wipe Test (v2): Ficha de registo de amostra

Ficha de registo de amostra Recomenda-se que esta ficha de registo de amostra seja fotocopiada antes da utilização, uma vez que o kit de testes de limpeza contém testes suficientes para testar 36 zonas (3 zonas de limpeza por tira de 8 poços, 12 tiras por kit).

Data do teste:

Teste efectuado por:









Aprovado por:

Outra informação:

Número de lote do kit:

Reacção	Corante	Utilizar (ver Instruções)	Resultado do teste	Medida	Informação sobre a amostra
1	Vermelho	Controlo positivo: ADN			
2	Roxo	Controlo negativo: Água			
3	Azul	Teste de inibição - Zona 1			
4	Roxo	Teste de limpeza - Zona 1			
5	Azul	Teste de inibição - Zona 2			
6	Roxo	Teste de limpeza - Zona 2			
7	Azul	Teste de inibição - Zona 3			
8	Roxo	Teste de limpeza - Zona 3			

13. Legenda dos símbolos utilizados

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

14. Informação de contacto do 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



15. Traduções

Française :	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
Česky:	Překlady k dispozici
Dansk:	Tilgængelige oversættelser
Ελληνικά:	Διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítás rendelkezésre áll
Norsk:	Tilgjengelige oversettelser
Polski:	Tłumaczenia dostępne
Português:	Traduções disponíveis
Русский:	Переводы доступны
Slovensky:	Preklady k dispozícii
Türkçe:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

Histórico de revisão

Esta é a versão 2 deste documento.
 Correções: instruções da secção 8 e numeração das secções.