Instruções de utilização

Kits Olerup SSP®
para tipagem HLA
incluindo Taq polimerase

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

UTILIZAÇÃO

Os Kits *Olerup* SSP® para Tipagem HLA são kits de diagnóstico *in vitro* qualitativos para tipagem de ADN de alelos HLA Classe I e HLA Classe II. Os produtos são utilizados por profissionais médicos experientes com o objetivo de determinar o fenótipo HLA. O material de origem testado é ADN.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os Antigénios leucocitários humanos (HLA) eram anteriormente determinados por linfocitotoxicidade. Contudo, devido à taxa de erro e ao nível de resolução de alelos insuficiente, este teste foi substituído pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) com base em técnicas de tipagem de ADN. Na maioria das técnicas com base na PCR, o processo de PCR é utilizado apenas na etapa de replicação do ADN-alvo necessário, sendo necessária ainda uma etapa de pós-replicação para fazer a distinção entre os diferentes alelos. Pelo contrário, na metodologia PCR-SSP (sequence-specific primer - primer específico de sequência – SSP), a distinção entre os diferentes alelos acontece durante o processo de PCR. Tal reduz e simplifica a etapa de pós-replicação a uma simples etapa de detecção por electroforese em gel. Os resultados do teste SSP podem ser positivos ou negativos, não havendo necessidade para interpretações complicadas de resultados. Além disso, a resolução da tipagem do PCR-SSP é superior à das técnicas de tipagem com base na PCR, uma vez que cada par de primers define duas sequências com motivos localizadas em *cis*, ou seja, no mesmo cromossoma. Para terminar, devido à natureza sintética dos reagentes SSP a estabilidade foi melhorada e a variação entre lotes diminuiu.

PRINCÍPIO DE PROCEDIMENTO

A metodologia PCR-SSP baseia-se no princípio de que os primers oligonucleotídeos com ligação completa e quase completa sem extremidades 3' não ligadas, são mais eficazes para utilização na reação PCR, do que primers não ligados, por ADN polimerases termo-estáveis sem a reparação dos defeitos. Os pares de primers são concebidos para se ligarem a alelos simples ou grupo(s) de alelos, dependendo do grau de resolução de tipagem necessário. Com condições de PCR estritamente controladas, os pares de primers com ligação completa ou quase completa são favoráveis à amplificação, ou seja, um resultado positivo; pelo contrário, pares de primers não ligados não permitem a amplificação, ou seja, um resultado negativo.

Depois do processo de PCR, os fragmentos de ADN amplificados são separados por tamanho, por exemplo, através da técnica de eletroforese em gel de agarose, visualizados pela marcação com brometo de etídio e exposição a luz ultravioleta, documentados por fotografias e interpretados. A interpretação de resultados PCR-SSP baseia-se na presença ou ausência de produto(s) específico(s) de PCR. Os tamanhos relativos dos produtos específicos de PCR podem ser úteis para a interpretação dos resultados. A metodologia PCR-SSP para HLA foi originalmente descrita por O. Olerup em 1991 e 1992[1,2].

Uma vez que o processo da PCR pode ser negativamente afetado por vários fatores (por exemplo, erros de pipetagem, concentração reduzida de ADN, ADN de má qualidade, presença de inibidores PCR, precisão do termociclador) existe um par de primers de controlo interno incluído em todas as reações de PCR [2]. O par de primers de controlo positivo interno corresponde a regiões conservadas do gene da hormona de crescimento humano, presente em todas as amostras de ADN humano. Na presença de um produto PCR específico de um ou mais alelos HLA, o produto da banda de controlo positivo interno pode ser fraco ou ausente. Os produtos de amplificação gerados por pares de primers específicos HLA são mais pequenos do que os produtos de amplificação do par de primers de controlo positivo interno, mas maiores do que os dos primers não incorporados (ver Valores esperados).

REAGENTES

A. Identificação

Os kits *Olerup* SSP® para tipagem contêm primers específicos de sequência pré-optimizados e secos para a amplificação por PCR de alelos HLA e do gene da hormona de crescimento humano, Mistura de PCR incluindo a enzima *Taq* polimerase, folhas adesivas PCR e o panfleto das Instruções de utilização básicas.

As soluções de primer são previamente repartidas em alíquotas e secas nos poços de 0,2 ml das placas de parede fina para PCR. Cada poço da placa contém uma solução primer seca que consiste num primer de mistura específica, por exemplo, alelos e primers específicos do grupo HLA, bem como um par de primers de controlo positivo correspondente a sequências não-alélicas, e estão prontas para a adição de amostras de ADN, Mistura de PCR e H_2O.

Os primers são concebidos para uma amplificação ideal por PCR, ao utilizar a Mistura de PCR e o programa recomendado para executar os ciclos de ADN (ver Programar o Termociclador).

As tabelas de Especificidade e Interpretação ou a Ficha de trabalho específicas do lote, para alelos HLA específicos amplificados por cada mistura de primer podem ser obtidas no website https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/.

B. Advertências e precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro.*
2. Este produto não deve ser utilizado como o único fundamento de uma decisão clínica.
3. *Advertência de risco biológico*: todos os produtos sanguíneos devem ser tratados como potencialmente infeciosos. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer a garantia de que os produtos obtidos a partir do sangue humano não transmitirão agentes infeciosos.
4. *Advertência de risco biológico*: o brometo de etídio utilizado para a marcação do ADN na electroforese em gel de agarose trata-se de uma substância cancerígena. Como tal, deve ser manuseado utilizando equipamento de proteção adequado.
5. *Atenção*: utilize proteção ocular contra a luz UV, não devendo olhar diretamente para esta luz para observar ou fotografar os géis.
6. As pipetas e outros equipamentos utilizados para manipulações ***pós***-PCR ***não*** devem ser utilizados para manipulações ***pré***-PCR.
7. Consulte a Ficha de dados de segurança do material (http://www.labproducts.caredx.com) para mais informações.

C. Instruções de utilização

Ver Instruções de utilização.

D. Instruções de armazenamento

Armazene os componentes do kit no escuro e à temperatura indicada nos rótulos das embalagens.
Utilize o kit antes da data de validade impressa no rótulo da embalagem.

E: Depuração ou tratamento necessários para a utilização

Ver Instruções de utilização.

F. Indicações de instabilidade

1. Não utilize placas de primers cujos poços tenham fendas ou estejam danificados no bordo superior, pois tal pode causar evaporação durante a amplificação por PCR. Não utilize tampas para strips com fendas, pois tal pode causar evaporação durante a amplificação por PCR.
2. Os precipitados nos poços devem ser de cor vermelha. Caso estes se apresentem de cor amarela, tal pode ser um sinal de degradação.
3. A Mistura de PCR deve ter uma cor entre o vermelho e o roxo. Caso esta se apresente de cor amarela, tal pode ser um sinal de degradação.

REQUISITOS DO EQUIPAMENTO

A. Equipamento

Deve ser utilizado um termociclador que preencha os seguintes requisitos mínimos:

- tampa aquecida com uma temperatura de 104º C para uma termociclagem isenta de óleo
- bloco de amostras (alumínio, prata ou prata dourada) para utilizar com placas de 96 poços para PCR ou com tubos de reação de parede fina de 0,2 ml
- Os kits Olerup SSP são validados nos seguintes cicladores.
  Taxas de inclinação recomendadas:
  - GeneAmp 9700: Ciclador GeneAmp 9700 definido para o modo 9600. Isto corresponde a uma **taxa de inclinação de amostra** de 1,6°C/s para cima e 0,8°C/s para baixo.
  - ProFlex 1xbloco de 96 poços: Ciclador ProFlex PCR com uma taxa de inclinação de bloco de 3,0°C/s (cada passo 3,0°C/s). Uma **taxa de inclinação de bloqueio** de 3,0°C/s corresponde a uma taxa de inclinação de amostra de 1,52°C/s para cima e 1,36°C/s para baixo.
  - ProFlex 2xbloco de 96 poços: Ciclador ProFlex PCR com uma taxa de inclinação de bloco de 3,0°C/s (cada passo 3,0°C/s). Uma **taxa de inclinação de bloqueio** de 3,0°C/s corresponde a uma taxa de inclinação de amostra de 1,9°C/s para cima e 1,6°C/s para baixo.

  Nota: Taxas de inclinação mais altas do que o equivalente ao descrito podem ter um efeito sobre os resultados de tipagem. Observe também que o efeito sobre a tipagem pode diferir entre diferentes cicladores não validados, dependendo das configurações.
- variação da temperatura entre 4,0°C e 99,9°C
- precisão de temperatura de ±0,25°C entre 35°C e 99,9°C
- uniformidade de temperatura do bloco de amostras de ≤0,75°C entre 55°C e 95°C
- calibração de temperatura em relação a padrões de referência (por exemplo, NIST)

Programa de termociclador que utilize os parâmetros para os ciclos PCR descritos na secção B abaixo.

Para mais informações sobre o termociclador consulte o manual de utilizador do fabricante. Os termocicladores devem ser calibrados de acordo com as normas de acreditação da ASHI (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) ou da EFI (European Federation of Immunogenetics).

O termociclador deve ser programado antes de proceder às instruções de utilização descritas abaixo.

B. Parâmetros dos ciclos da PCR

1.	1 ciclo	94ºC	2 min	desnaturação
2.	10 ciclos	94ºC	10 seg.	desnaturação
		65ºC	60 seg.	hibridação e extensão
3.	20 ciclos	94ºC	10 seg.	desnaturação
		61ºC	50 seg.	hibridação
		72ºC	30 seg.	extensão
4.	Fim - conservar		TA	se menos de 8 horas
		4ºC		se mais de 8 horas

Volume de reação total em cada poço, 10 µl.

Os mesmos parâmetros para os ciclos da PCR são utilizados em todos os kits *Olerup* SSP®.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Para a tipagem SSP será necessário utilizar ADN puro extraído. Amostras de ADN a utilizar para tipagem de PCR-SSP HLA devem ser novamente suspensas em dH_2O. O rácio $A_{260/280}$ deve ser de 1,6 a 2,0 por espetrofotometria UV para visualização da banda ideal durante a eletroforese.

Recomenda-se a extração automática do ADN com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. O sangue com o anticoagulante ACD deve ser utilizado como material primário.

Como alternativa, o ADN pode ser extraído por meio de um outro método de colheita de ADN puro. Ao utilizar métodos alternativos, a concentração de ADN deve ser ajustada para 30 ng/µl. ***Não use sangue heparinizado com estes métodos.***

Concentração de ADN recomendada utilizando:
Extração de ADN por EZ1, 15 ng/µl.
Extração de ADN por outros métodos, 30 ng/µl.

Todas as concentrações que excedam os 50 ng/µl irão aumentar o risco de amplificações não específicas e bandas extra fracas, principalmente para tipagens por SSP de HLA Classe I de alta resolução. Se necessário, dilua o ADN extraído em$_2$O.

As amostras de ADN não devem ser novamente suspensas em soluções contendo agentes quelantes, tais como EDTA, em concentrações superiores a 0,5 mM.

Para que não tenham quaisquer efeitos adversos sobre os resultados, as amostras de ADN devem ser utilizadas imediatamente após a extração ou armazenadas a +4°C durante um período máximo de 2 semanas. As amostras de ADN podem ser armazenadas a uma temperatura de -20°C ou inferior durante um período de 9 meses. A pureza e a concentração das amostras de ADN extraído que tenham sido armazenadas durante longos períodos, devem ser testadas antes de serem utilizadas para a tipagem HLA.

O envio das amostras de ADN deve ser feito a uma temperatura de +4ºC ou inferior, para preservar a integridade das mesmas durante o transporte.

PROCEDIMENTO

A. Materiais fornecidos

1. Placas de primers *Olerup* SSP®.
2. Mistura de PCR (volume apropriado para as placas do kit). A mesma Mistura de PCR é utilizada em todos os kits *Olerup* SSP®.
3. Folhas adesivas PCR (número apropriado para as placas do kit).
4. Panfleto das Instruções de utilização básicas.

B. Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Kit/Equipamento para o isolamento do ADN
2. Espetrofotómetro UV
3. Dispositivos de pipetagem. Recomenda-se um dispensador electrónico de um canal capaz de fazer a distribuição de alíquotas de 10 µl para adicionar a mistura ADN-Mistura de PCR-$_2$O aos poços das placas.
4. Pontas de pipeta descartáveis
5. Tubos de polipropileno
6. Agitador vortex
7. Microcentrífuga
8. Suporte da placa para PCR
9. Termociclador com tampa aquecida para PCR com formato de 96 poços, um gradiente de temperatura para o bloco de aquecimento ≤ 0,75°C, e uma placa/retentor para poços de reação de parede fina de 0,2 ml
10. Micro-ondas ou placa de aquecimento para aquecer as soluções de agarose
11. Agarose de grau de eletroforese, por exemplo, FMC Seakem LE
12. Tampão TBE0,5 x; Tampão TBE 1x - 89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA dissódico, pH 8,0
13. Frasco conta-gotas de brometo de etídio, Produto N.º 103.301-10
14. Dispositivo de pipetagem para distribuir o gel. Recomenda-se a utilização de uma pipeta de 8 canais para a distribuição do gel, com volume ajustável de 5-25 µl
15. Marcador de ADN para determinar o tamanho de fragmentos entre 50 – 1 000 bp, por exemplo, escada padronizada em 100 pares de base, Marcador de ADN Produto N.º 103.202-100 ou Marcador de ADN para ensaios com gel 103.203-100

16. Aparelho de eletroforese/fonte de alimentação
17. Transiluminador UV
18. Sistema de documentação de imagem ou fotográfico

C. Procedimento passo a passo

Ver Instruções de utilização.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

A. Preparação da amostra

1. Purifique o ADN genómico a partir da amostra de leucócitos utilizando o método de eleição, consulte a secção Colheita e preparação de amostras acima.
2. Para obter mais informações sobre a preparação e o armazenamento de amostras, consulte a secção Colheita e preparação de amostras acima.
3. Efetue a amplificação por PCR na amostra de ADN purificada utilizando uma placa de tipagem *Olerup* SSP® ou armazene a amostra de ADN até tudo estar preparado para a tipagem.

B. Preparação do Reagente/Equipamento

1. Programe um termociclador para executar o programa de PCR *Olerup* SSP®, consulte a secção Requisitos do equipamento – Parâmetros dos ciclos da PCR acima.
2. Prepare o gel de eletroforese, consulte a secção C – **Preparação** da **eletroforese em gel** abaixo.

C. Preparação da eletroforese em gel

Para o sistema de gel 96 *Olerup* SSP® (Produto N.º 103.101-01)

1. Configurar
   - Nivele a câmara de moldagem para 1 gel (Produto N.º 103.101-31) ou para 3 géis (Produto N.º 103.101-33) utilizando a bolha niveladora e as três pernas ajustáveis em altura.
   - Colocar a(s) placa(s) de gel na câmara de moldagem.
2. Preparação do gel de agarose a 2% (w/v)
   Utilize uma agarose de electroforese de elevada qualidade, para a resolução de fragmentos de ADN de 50 - 2000 pares de base.
   - Adicione 150 ml de água destilada e 2 g de agarose num frasco de vidro de 500 ml a 5 ml de tampão TBE 10 x (Tris-borato EDTA).
   - Dissolva a agarose, fervendo-a num micro-ondas até que se forme uma solução homogénea de 100 ml.
   - Deixe que a solução de gel dissolvida arrefeça a 60ºC, por exemplo, num receptáculo de aquecimento.
   - Marque o gel, antes da moldagem, com brometo de etídio (10 mg/ml), 5 µl por 100 ml de solução de gel. Para uma manipulação

mais facilitada, utilize os frascos conta-gotas de brometo de etídio (Produto N.º 103.301-10). **Nota: O brometo de etídio é uma substância cancerígena. Como tal, deve ser manuseado utilizando equipamento de proteção adequado.**

- Verta 100 ml de solução de gel na placa de gel na câmara de moldagem. Coloque 6 pentes de gel (Produto No. 103.101-21) nas aberturas da placa de gel.
- Deixe assentar durante 15 minutos.
- Verta 750 ml de tampão TBE 0,5 x na caixa de gel. Submerja a placa de gel na caixa de gel e, cuidadosamente, retire os 6 pentes de gel, levantando-os.

Siga as instruções do fabricante aquando da utilização de sistemas de eletroforese alternativos. Para poderem ser utilizados com os Kits *Olerup* SSP® para Tipagem HLA, estes sistemas devem estar preparados para a resolução de produtos de PCR com tamanho entre 50 e 1100 pares de base.

D. Procedimento passo a passo

1. Remova da(s) temperatura(s) de armazenamento indicada(s): o número adequado de amostras de ADN, a(s) placa(s) de primers e o volume de Mistura de PCR necessários para as amostras de ADN/placa(s) de primers seleccionada(s). Descongele à temperatura ambiente (20 a 25ºC).

A mesma Mistura de PCR é utilizada em todos os kits *Olerup* SSP®.

2. Misture a(s) amostra(s) de ADN utilizando o agitador vortex.
3. Coloque a(s) placa(s) de primers no suporte da placa para PCR.
4. **Kits de baixa e alta resolução**
   - Leve a Mistura de PCR ao agitador vortex antes da extração de alíquotas.
   - Utilizando uma pipeta manual de um canal, adicione, à temperatura ambiente, Mistura de PCR e dH_2O num tubo de 0,5 ml ou 1,5 ml. (Consulte a tabela 1 abaixo para saber as quantidades adequadas.)
   - Tape o tubo e leve ao agitador vortex durante 5 segundos. Coloque o tubo numa micro-centrífuga para que todo o líquido se solte das paredes do tubo.
   - Utilizando uma pipeta manual de um canal, adicione 8 µl da mistura de Mistura de PCR, dH_2O e 2 µl dH_2O no poço de controlo negativo, ou seja, o poço com os pares de primers de controlo negativo da placa de primers.
   - Utilizando uma pipeta manual de um canal, adicione a amostra de ADN à temperatura ambiente à restante mistura de Mistura de PCR e dH_2O. (Consulte a tabela 1 abaixo para saber as quantidades adequadas.)

- Tape o tubo e leve ao agitador vortex durante 5 segundos. Coloque o tubo numa micro-centrífuga para que todo o líquido se solte das paredes do tubo.
- Utilizando um dispensador electrónico de um canal coloque uma alíquota de 10 µl da mistura de reação da amostra em cada um dos poços, exceto no poço do controlo negativo da placa de primers.

Tabela 1: Volumes dos componentes necessários por teste para diferentes números de poços ao utilizar Mistura de PCR.

N.º de poços por teste	Volume da Mistura de PCR (µl)	Volume da amostra de ADN (µl)	Volume de dH_2O (µl)
2	12	8	20
3	15	10	25
4	18	12	30
5	21	14	35
6	24	16	40
7	27	18	45
8	30	20	50
9	33	22	55
10	36	24	60
11	39	26	65
12	42	28	70
13	45	30	75
14	48	32	80
15	51	34	85
16	54	36	90
17	60	40	100
18	63	42	105
19	66	44	110
20	69	46	115
21	72	48	120
22	75	50	125
23	78	52	130
24	81	54	135

N.º de poços por teste	Volume da Mistura de PCR (µl)	Volume da amostra de ADN (µl)	Volume de dH_2O (µl)
25	87	58	145
26	90	60	150
27	93	62	155
28	96	64	160
29	99	66	165
30	102	68	170
31	105	70	175
32	108	72	180
36	126	84	210
40	138	92	230
44	150	100	250
48	162	108	270
52	174	116	290
56	186	124	310
60	198	132	330
64	210	140	350
68	228	152	380
72	240	160	400
76	252	168	420
80	264	176	440
84	276	184	460
88	288	192	480
92	300	200	500
96	312	208	520

Os volumes acima recomendados já incluem volume para compensar as variações de pipetas e as perdas de líquido nas paredes interiores dos tubos.

5. **Combi kits A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ e DQA-DQB-DR Enhanced e o HLA-C de alta resolução para kit de alelos frequentes**
   - Leve a Mistura de PCR ao agitador vortex.
   - Utilizando uma pipeta manual de um canal, adicione, à temperatura ambiente, 520 µl dH_2O no tubo de 1,5 ml fornecido contendo 312 µl de Mistura de PCR.
   - Tape o tubo e leve ao agitador vortex durante 5 segundos. Coloque o tubo numa micro-centrífuga para que todo o líquido se solte das paredes do tubo.

- Utilizando uma pipeta manual de um canal, adicione 8 µl da mistura de Mistura de PCR, dH_2O e 2 µl $dHdH_2O$ no poço de controlo negativo N.º 96, isto é, o poço com os pares de primers de controlo negativo.
- Utilizando uma pipeta manual de um canal, adicione 206 µl da amostra de ADN à temperatura ambiente à restante mistura de Mistura de PCR e $dHdH_2O$.
- Tape o tubo e leve ao agitador vortex durante 5 segundos. Coloque o tubo numa micro-centrífuga para que todo o líquido se solte das paredes do tubo.
- Utilizando um dispensador electrónico de um canal coloque uma alíquota de 10 µl da mistura de reação da amostra em cada um dos poços, excerto no poço do controlo negativo N.º 96 da placa de primers.

Importante:

Certifique-se de que aplica a amostra por cima dos primers (secos na base de cada poço da placa de primers) para evitar a contaminação cruzada entre poços. Toque na parede interior do tubo com a ponta da pipeta para permitir que a amostra deslize até à base do poço. Verifique que todas as amostras escorreram para a base de cada poço. Se tal não suceder, bata suavemente com a placa no topo da bancada, para que todas as amostras assentem na base do tubo antes de iniciar a PCR.

6. Tape a(s) placa(s) de primers com as folhas adesivas PCR fornecidas. Verifique se todos os poços de reação estão completamente cobertos para prevenir a perda por evaporação durante a amplificação por PCR. A almofada de compressão*Olerup* SSP® (Produto N.º 103.505-06) pode colocar-se por cima das folhas adesivas PCR para evitar a evaporação durante o ciclo termal.
7. Coloque a(s) placa(s) de primers no termociclador com um adaptador para placa de tubos adequado. Não deixe que haja um intervalo superior a 5 minutos entre a configuração da PCR e o ciclo termal.
8. Introduza o seu número de programa *Olerup* SSP®. Especifique um volume de reação de 10 µl.
9. Inicie o programa de PCR. O programa demora aproximadamente 1 hora e 20 minutos.
10. Retire a(s) placa(s) de primers do termociclador. Verifique a placa para PCR para garantir que o volume de fluido é aproximadamente o mesmo em cada poço da PCR. Submeta as amostras a electroforese, consulte a secção E - Gel de eletroforese abaixo. Interprete os resultados da tipagem utilizando as ***tabelas de Especificidade e Interpretação ou a Ficha de trabalho específicas do lote***, consulte a secção Valores esperados abaixo.

E. Eletroforese em gel

1. Depois de concluir a reação de PCR oriente a placa de primers e a caixa de gel. A ordem dos poços é da esquerda para a direita e de cima para baixo.
2. Retire cuidadosamente as tampas de tira sem salpicar os produtos de PCR.
3. Carregue os produtos de PCR em sequência ao gel de agarose a 2%. (Não é necessário adicionar nenhum tampão de distribuição de gel.) Recomenda-se a utilização de uma pipeta de 8 canais para a distribuição do gel.
4. Carregue um marcador de ADN (escada padronizada em 100 pares de base, Marcador de ADN Produto N.º 103.202-100 ou Marcador de ADN para ensaios com gel 103.203-100) num poço por linha.
5. Tape a caixa de gel com a respetiva tampa
6. Submeta o gel à electroforese em Tampão TBE 0,5 x, sem a recirculação do tampão, durante 15-20 minutos a 8-10 V/cm.
7. Transfira a placa de gel com o gel para um transiluminador UV.
8. Fotografe o gel com ou sem a placa de gel.
9. Marque a fotografia de acordo com as regras do laboratório.

CONTROLO DE QUALIDADE

As normas de teste da ASHI indicam que um poço de controlo negativo (contaminação) deve ser incluído em cada configuração PCR. (Standards for Accredited Laboratories, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Final Revised Standards Approved by the ASHI Board of Directors: August 31, 2007, Guidance Final Version January 2008). Um poço de controlo negativo está incluído em todos os kits do lote 01V e em diante (o kit DQ inferior do lote 06Y e em diante).

Consulte a secção Interpretação do gel na página 14.

RESULTADOS

As Folhas de validação da linha da célula e o Certificado de análise específicos do lote estão disponíveis online, https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. O processo PCR-SSP necessita de condições de teste altamente controladas que visam garantir uma amplificação discriminatória adequada. O procedimento descrito em Instruções de utilização devem ser estritamente respeitados.
2. A amostra de ADN extraído serve de modelo para o processo de amplificação específico por PCR. A relação $A_{260/280}$ do ADN purificado deve estar entre 1,6 e 2,0 para obter uma visualização óptima da banda por eletroforese.
3. Todos os equipamentos, por exemplo, termociclador e dispositivos de pipetagem, devem ser calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

4. Para informações específicas do lote, consulte o Folheto informativo: Informações específicas do lote e a Ficha de trabalho específica do lote.
5. Com base nos testes executados, as seguintes substâncias foram avaliadas com três (3) métodos de extração a concentrações sem qualquer impacto para o desempenho do teste.

Método de extração	Substância interferente	Concentração interferente*
EZ1 DSP DNA Blood System	Bilirrubina	200mg/L
	Hemoglobina	200g/L
	Triglicérido	30g/L
	Proteína	110g/L
QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirrubina	200mg/L
	Hemoglobina	200g/L
	Triglicérido	18,2 g/L
	Proteína	77 - 96g/L
Gentra PureGene method	Bilirrubina	200mg/L
	Hemoglobina	200g/L
	Triglicérido	18,2 g/L
	Proteína	119 -146 g/L

6. As placas para PCR são compatíveis com a maior parte dos termocicladores disponíveis no mercado. Verifique a compatibilidade plástica do termociclador na tabela abaixo.
   Nota: Esta tabela serve apenas como um guia. Para os cicladores validados, consulte requisitos de instrumentos de secção - Instrumento.

Tabela de compatibilidade	
Fabricante	**Termociclador**
Biosistemas aplicados	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-poço
	ProFlex 2x96-poço
	Veriti 0,2ml bloco de 96 poços
	GeneAmp 2700, 2720, 9600
Agilent (Stratagene)	SureCycler 8800
	RoboCycler
	Gradient Cycler
Biometra	Uno, Uno II
	T1 Thermocycler
	TGradient/TAdvanced
	TRobot

	TProfessional
Bio-Rad	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
	C1000, S1000
	PTC-2(xx)
	PTC-100 com bloco de 96 poços
Eppendorf	Mastercycler Gradient
	Mastercycler EP Gradient, Pro, Nexus
MWG	Primus 96
	TheQ Lifecycler
Thermo Scientific	Arktik
Techne	Flexigene, TC-412, TC-4000
	Genius, Touchgene, TC-512, TC-5000
	TC-PLUS, Prime, PrimeG, Prime Elite
Thermo Scientific Hybaid	PCR Express, Px2, PxE
	MultiBlock System & MBS
	Omnigene, Omn-E
Gene Technologies	GS1, GS4, GSX
Takara	TP 3000

VALORES ESPERADOS

A. Análise de Dados

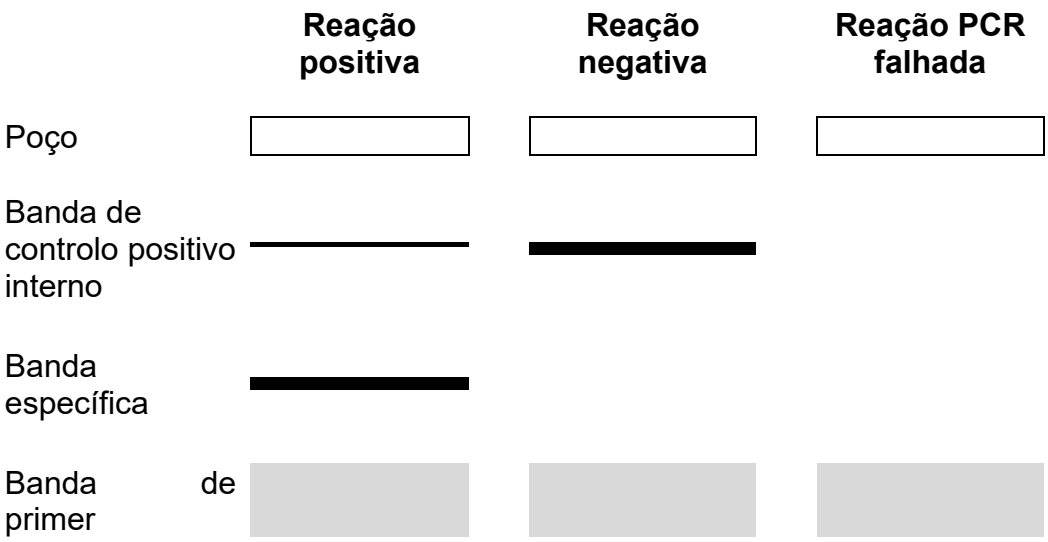
Examine cuidadosamente a fotografia do gel e determine a trajetória positiva.

1. Uma migração mais rápida, banda mais curta, será observada numa trajetória de gel, caso alelos HLA específicos tenham sido amplificados. Tal indica um resultado de teste positivo.
   a. Registe a presença e a ausência de produtos de PCR específicos.
   b. É útil fazer a monitorização dos comprimentos relativos dos produtos de PCR específicos, tal como indicado no folheto informativo específico do lote, ao interpretar os resultados do gel. Várias trajetórias têm duas ou mais possibilidades de comprimento de produtos de PCR específicos. Os poços contêm vários pares de primers geradores de produtos de PCR com diferentes tamanhos, dependendo dos alelos HLA do ADN da amostra.
   c. Faça corresponder o padrão de trajetórias de gel com produtos de PCR específicos nas tabelas de Especificidade e Interpretação específicas do lote, para obter a tipagem HLA do ADN da amostra.
2. Deverá ser sempre visível uma banda de controlo positivo interno, de migração mais lenta e comprida, em todas as trajetórias de gel, exceto na trajetória de gel do controlo negativo, como um controlo com uma amplificação bem sucedida. A banda de controlo positivo pode estar fraca ou ausente na trajetórias de gel positivas.

a. Registe a presença e os comprimentos relativos das bandas de controlo positivo interno. As bandas de controlo de diferentes tamanhos vão ajudar com a correta orientação da tipagem, bem como com a identificação do kit.
b. A ausência de banda de controlo positivo interno sem produto de PCR específico indica uma reação de PCR falhada.
   i. Se os alelos poderem ser determinados na presença de reações de PCR falhadas e estas mesmas reações não alterarem a transferência de alelos, o teste não tem de ser repetido.
   ii. No entanto, se as reações de PCR falhadas puderem alterar a transferência de alelos HLA, a tipagem deve ser repetida.

3. A presença de produtos de PCR específicos de uma banda de controlo positivo interno em trajetórias de controlo negativo indicam contaminação com produtos de PCR e invalidam todos os resultados do teste. Oligómeros em primers com tamanho entre 40 - 60 pares de base podem ser observados nas trajetórias de controlo negativo. Tal não é sinónimo de contaminação.

B. Interpretação do gel



1. Um marcador de ADN (escada padronizada em 100 pares de base, Marcador de ADN Produto N.º 103.202-100 ou Marcador de ADN para ensaios com gel 103.203-100) deve integrar um poço por linha do gel ou de acordo com as diretrizes locais de acreditação laboratorial.
2. As bandas maiores do que a banda de controlo positivo interno podem ocorrer e estas não devem ser consideradas aquando da interpretação dos resultados de tipagem.
3. Os primers não utilizados irão formar uma banda difusa menor que 50 pares de base.

4. Artefactos de oligómeros em primers podem ser observados. Estas são maiores que uma banda de primer, mas menores que bandas específicas.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

Lote de controlo de qualidade do kit

Cada solução de primer é testada em comparação a um conjunto de 48 amostras de ADN de linhas de célula bem caracterizadas do IHWC, consulte a(s) Folha(s) de validação da linha da célula em Folheto informativo, Informações específicas do lote.

Estudo comparativo 1 do método

Este foi um estudo multicêntrico de avaliação da concordância do Kit *Olerup* SSP® DR de Baixa Resolução para Tipagem HLA e da Placa de Tipagem HLA DNA One Lambda Micro SSP™ em três laboratórios clínicos nos Estados Unidos.

Os resultados de tipagem analisados do Kit *Olerup* SSP® DR de Baixa Resolução para Tipagem HLA e da Placa de Tipagem HLA DNA One Lambda Micro SSP™ mostraram uma concordância de 98,4% (123/125; 95% CI: 94,3 – 99,8) quando dois resultados Olerup ambíguos são considerados discordantes. A concordância foi de 100% (123 / 123; 95% CI: 97,1 – 100) quando os resultados Olerup ambíguos não foram incluídos na análise, reflexo de uma prática clínica normal.

Estudo comparativo 2 do método

Este estudo foi concebido para mostrar a concordância dos resultados de tipagem de baixa resolução de alelos HLA (A, B, C, DQ) obtidos com os kits de investigação *Olerup* SSP® para Tipagem HLA e os kits de referência One Lambda LABType SSO. A colheita de amostras de sangue total ACD foi feita a partir de 95 doentes distribuídos por 3 clínicas nos Estados Unidos. A extração de ADN foi executada e o ADN purificado daí resultante foi testado com os métodos de investigação Olerup SSP® e o de referência One Lambda LabType SSO HLA.

A concordância geral para alelos de Classe I foi de 99,6% (278 / 279; 95% CI: 98,0 - 100). Para alelos de Classe II a concordância foi de 100% (94 / 94; 95% CI: 96,2 – 100).

Tabela 1
Concordância geral dos resultados de Olerup SSP® e OneLambda SSO para alelos de Classe I e Classe II.

	Total	
Locus HLA	**n/N**	**% de concordância (95% CI)**
A	95 / 95	100 (96,2 – 100)
B	90 / 90	100 (96,0 – 100)
C	93 / 94	98,9 (94,2 – 100)
Todos os Loci de Classe I	278 / 279	99,6 (98,0 – 100)
Loci de Classe II (DQ)	94 / 94	100 (96,2 – 100)

Estudo dos resultados de reprodutibilidade do kit.

Este estudo comparou os resultados do *Olerup* SSP® para Tipagem HLA entre testes HLA laboratoriais utilizando um painel de 10 amostras de ADN bem caracterizadas, cujos resultados consensuais estão incluídos no Banco UCLA HLA ADN para HLA de Classe I (A, B e C), alelos de Classe II comuns (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* e DQB1*) e alelos de Classe II menos investigados (DQA1*, DPA1* e DPB1*).

Tabela 2: Resumo do estudo dos resultados de reprodutibilidade do kit Olerup SSP ® HLA

Tipo de alelo HLA	% Precisão de tipagem n/N Intervalo de confiança a 95% (LL, UL)	
	Resultado ambíguo considerado discordante	*Resultado ambíguo considerado indeterminado e excluído da análise*
Classe I por baixa resolução (Combinação de A e B)	98,3 (59/60) 91,1, 100	100 (59/59) 93,9, 100
Classe I por alta resolução (Combinação de A, B e C)	94,7 (142/150) 89,8, 97,7	98,6 (142/144) 95,1, 99,8
Classe II por baixa resolução (DRB1 e DRB3*/DRB4*/DRB5*)*	100 (60/60) 94,0, 100	100 (60/60) 94,0, 100
Classe II por alta resolução - alelos comuns (DRB1, DRB3*/DRB4*/DRB5* e DQB1*)*	98,3 (118/120) 94,1, 99,8	100 (118/118) 96,9, 100
Classe II por alta resolução Alelos menos investigados (DQA1, DPA1*, and DPB1*)*	83,3 (75/90) 74,0, 90,4	86,2 (75/87) 77,2, 92,7

Este estudo utilizou um painel de dez (10) amostras de ADN com resultados de tipagem HLA bem caracterizados.

As concordâncias inferiores observadas para os alelos de Classe II por alta definição menos investigados reflete a maior incerteza nos "resultados consensuais" das amostras de ADN da UCLA, tendo em conta a informação de sequência incompleta disponível para alelos DQA1*, DPA1* e DPB1*. Para 9 dos 11 resultados discordantes observados durante o estudo de reprodutibilidade (uma chamada DQA1*0505 da Olerup SSP® vs. DQA1*0501 "tipagem consensual") em todos os três locais de testes chegaram ao mesmo resultado indicando desempenho consistente do kit Olerup DQA1*.

BIBLIOGRAFIA

1. Olerup O, Zetterquist H. *HLA-DRB1*01* subtyping by allele-specific PCR-amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991: **37**: 197-204.
2. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens* 1992: **39**: 225-235.
3. Os alelos HLA atuais podem encontrar-se em:
   a. http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla ou
   b. http://www.anthonynolan.org.uk/HIG

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Problema	Motivo	Ação
Sem amplificação (nem amplificação dos fragmentos de controlo interno, nem amplificações específicas).	Quantidade insuficiente de ADN.	Meça a concentração de ADN e veja se a quantidade adicionada é a correta. A contaminação por RNA pode causar um cálculo excessivo de espetrofotometria da concentração de ADN. Repita cuidadosamente a extração do ADN utilizando soluções preparadas de novo. Recomenda-se a extração automática do ADN com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	O ADN contém inibidores PCR, por exemplo, proteínas, etanol (de etapas de precipitação), matrizes residuais da purificação do ADN na fase sólida.	Meça a qualidade do ADN. Recomenda-se uma relação A260/A280 de 1,6 – 2,0 por espetrofotometria UV. Siga o protocolo de extração de ADN do fornecedor de forma exata. Volta a extrair o ADN. Recomenda-se a extração automática do ADN com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	O ADN foi extraído de sangue heparinizado.	Utilize sangue não heparinizado ou siga os protocolos de extração de ADN para sangue heparinizado.
	O ADN é dissolvido num tampão contendo EDTA.	Repita a extração do ADN e dissolva o ADN em dH_2O.

Problema	Motivo	Ação
Continuação: **Sem amplificação (nem amplificação dos fragmentos de controlo interno, nem amplificações específicas).**	Introdução acidental de lixívia no teste.	Reexaminar as áreas onde a lixívia possa ter sido introduzida.
	Os kits não foram armazenados à temperatura adequada.	Armazene os kits a uma temperatura de -20°C.
	O termociclador não está a funcionar de forma correta.	Faça a calibração do termociclador e verifique o programa de PCR. Um termociclador utilizado para a tipagem PCR-SSP de rotina deve ser calibrado a cada 6-12 meses.
	Contacto inadequado entre o bloco de aquecimento do termociclador e a placa de tipagem SSP.	Utilize a placa/retentor correto para os poços de reação de parede fina de 0,2 ml, consulte o manual do termociclador.
Falha aleatória da amplificação (perdas).	As folhas PCR/tampas de tubos PCR que não estiverem corretamente colocadas vão permitir a evaporação e originar uma falha na amplificação.	Certifique-se de que todas as folhas/tampas PCR estão corretamente colocadas. A almofada de compressão *Olerup* SSP® (Produto Nº. 103.505-06) pode colocar-se por cima das folhas adesivas PCR para evitar a evaporação durante o ciclo termal.
	Erros na distribuição do gel.	Verifique que o número correto de poços foi carregado e que cada poço contém, aproximadamente, o mesmo volume de mistura de PCR.
	Utilização de pipetas não calibradas.	Faça a calibração de todas as pipetas com frequência, de acordo com as recomendações do fornecedor.
	Erros de pipetagem.	Execute a pipetagem cuidadosamente.

Problema	Motivo	Ação
	A Mistura de PCR e o ADN da amostra não foram corretamente misturados antes da utilização.	Misture brevemente no agitador vortex antes de utilizar. Recomenda-se que leve ao agitador vortex após cada linha.
	Foi adicionado volume irregular da mistura ADN-Mistura de PCR aos poços.	Execute a pipetagem cuidadosamente.
Fragmentos de controlo interno fracos.	ADN impuro.	Meça a qualidade do ADN. A relação $A_{260/280}$ deve ser de 1,6 a 2,0 por espectrofotometria UV. A contaminação por RNA pode causar um cálculo excessivo de espetrofotometria da concentração de ADN. O ADN degradado dá origem a manchas nas trajetórias de gel. Repita cuidadosamente a extração do ADN utilizando soluções preparadas de novo. Recomenda-se a extração automática do ADN com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Quantidade insuficiente de ADN.	Meça a concentração de ADN e ajuste para 30 ng/µl ou 15 ng/µl para ADN extraído com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. A contaminação por RNA pode causar um cálculo excessivo de espetrofotometria da concentração de ADN. O ADN degradado dá origem a manchas nas trajetórias de gel. Repita cuidadosamente a extração do ADN utilizando soluções

Problema	Motivo	Ação
		preparadas de novo. Recomenda-se a extração automática do ADN com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
Continuação: **Fragmentos de controlo interno fracos.**	A temperatura de hibridação está demasiado alta, o termociclador não está calibrado.	Faça a calibração do termociclador e verifique o programa de PCR. Um termociclador utilizado para a tipagem PCR-SSP de rotina deve ser calibrado a cada 6-12 meses.
	A Mistura de PCR foi armazenada a uma temperatura de +4°C durante um período superior a 2 semanas.	Armazenar corretamente o Misturador Principal PCR.
Amplificação não específica (escadas e manchas).	Utilização excessiva da amostra de ADN.	Meça a concentração de ADN e ajuste para 30 ng/µl ou 15 ng/µl para ADN extraído com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Algumas soluções de primers têm uma maior tendência para originar amplificações não específicas, consulte as notas de rodapé presentes em cada uma das tabelas Especificidade específicas do lote.
	ADN impuro.	Todos os fragmentos maiores que o fragmento de controlo interno devem ser ignorados aquando da interpretação dos resultados obtidos. Verifique a qualidade do ADN. Volte a extrair o ADN. Recomenda-se a

Problema	Motivo	Ação
		extração automática do ADN com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Algumas soluções de primers têm uma maior tendência para originar amplificações não específicas, consulte as notas de rodapé presentes em cada uma das tabelas Especificidade específicas do lote.
Sinais de amplificação cada vez mais fracos com o passar do tempo.	A solução de brometo de etídio para marcação do gel de agarose é antiga.	Prepare uma nova solução de brometo de etídio para conseguir uma melhor marcação do gel de agarose e um melhor sinal. As nuvens de primer são fáceis de identificar, se a marcação do gel de agarose estiver normal.
	Uma das lâmpadas de UV não funciona.	Verifique o equipamento de iluminação UV. As nuvens de primer são fáceis de detetar se a iluminação UV estiver normal.
	Foi utilizada uma amostra de ADN muito pequena.	Meça a concentração de ADN e ajuste para 30 ng/µl ou 15 ng/µl para ADN extraído com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	A temperatura de hibridação está demasiado alta, o termociclador não está calibrado.	Faça a calibração do termociclador e verifique o programa de PCR. Um termociclador utilizado para a tipagem PCR-SSP de rotina deve ser calibrado a cada 6-12 meses.

Problema	Motivo	Ação
Padrões de amplificação estranhos.	Foi utilizada uma Tabela de interpretação/Ficha de trabalho específica do lote incorreta.	Verifique o número do lote do produto utilizado e a Tabela de interpretação/Ficha de trabalho utilizada.
	Ordem incorreta na distribuição do gel.	Verifique o alinhamento das misturas e trajetórias de gel.
	O padrão de amplificação contém um falso positivo.	Veja abaixo.
	O padrão de amplificação contém um falso negativo.	Veja abaixo.
Amplificações de falsos positivos.	Contaminação do ADN.	Utilize luvas, pontas de pipeta com barreira (filtro) e locais separados para executar as manipulações de pré-PCR e pós-PCR. Assegure uma manipulação precisa de todas as amostras, em todas as etapas. Verifique se há contaminação utilizando um kit *Olerup* SSP® Wipe Test.
	ADN impuro.	Meça a qualidade do ADN. Siga o protocolo de extração de ADN do fornecedor de forma exata. Tente outros sistemas de extração de ADN. Volta a extrair o ADN. Recomenda-se a extração automática do ADN com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Utilização excessiva da amostra de ADN.	Meça a concentração de ADN e ajuste para 30 ng/µl ou 15 ng/µl para ADN extraído com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.

Problema	Motivo	Ação
	Temperatura de hibridação demasiado baixa.	Faça a calibração do termociclador e verifique o programa de PCR. Um termociclador utilizado para a tipagem PCR-SSP de rotina deve ser calibrado a cada 6-12 meses.
	Intervalo extenso entre a configuração da PCR e o ciclo termal.	Não deve haver um intervalo superior a 5 minutos antes do ciclo termal.
	Tempo de espera entre a colocação das placas de tipagem e o início do ciclo.	Utilize um termociclador pré-aquecido.
Continuação: **Amplificações de falsos positivos.**	Utilização de brometo de etídio em excesso.	Utilize a quantidade recomendada de brometo de etídio.
	Interpretação incorreta de um artefacto como uma banda específica.	Verifique Tabela de interpretação/Ficha de trabalho e tabela de Especificidade específica do lote para consultar o tamanho correto da banda e as notas de rodapé.
	O padrão de amplificação contém um falso positivo.	Verifique se todas as amplificações específicas têm um tamanho incorreto ou se um artefacto (transporte, dímero de primers) foi erradamente interpretado como uma amplificação.
	Ordem incorreta na distribuição do gel.	Verifique o alinhamento das misturas e trajetórias de gel.
Amplificações de falsos negativos.	O termociclador não está corretamente calibrado.	Faça a calibração do termociclador e verifique o programa de PCR. Um termociclador utilizado para a tipagem PCR-SSP de rotina deve ser calibrado a cada 6-12 meses. Se o problema persistir

Problema	Motivo	Ação
		depois de voltar a calibrar, volte a correr o teste com uma amostra de referência com a mesma especificidade. Se continuar negativo, contacte a assistência ao cliente.
	Ordem incorreta na distribuição do gel.	Verifique o alinhamento das misturas e trajetórias de gel.
Problemas gerais com o gel (géis pouco nítidos e/ou trajetórias manchadas).	Amostra de ADN degradado.	Aparece como uma mancha nas trajetórias de gel. Isole o ADN de uma amostra recente.
	Grandes falhas em poços aleatórios.	Suspensões irregulares de ADN. Certifique-se que o ADN da amostra é dissolvido antes da extração de alíquotas. Dilua a amostra de ADN no agitador vortex.
	O produto de PCR saiu do poço.	Alinhe cuidadosamente as pontas de pipeta com os poços de gel e faça a distribuição devagar.
	O tampão da eletroforese pode estar muito quente.	Prepare um novo tampão TBE. Execute a uma voltagem inferior.
	Foi utilizada uma percentagem incorreta do gel de agarose.	Certifique-se de que utiliza gel de agarose a 2% como é recomendado.
	Agarose não totalmente dissolvido.	Dissolva rapidamente a agarose.
	Concentração de TBE incorreta.	Utilize a concentração 0,5 x TBE recomendada.
	Géis moldados há pouco tempo.	Os géis só estão prontos para serem utilizados, 15 minutos depois da moldagem.
	Géis muito antigos.	Não molde os géis com muita antecedência.
	O pente de gel utilizado tem duas aberturas	Utilize pentes finos (4 x 1 mm).

Problema	Motivo	Ação
	grossas.	
	Placa de gel não transparente a UV.	Retire o gel da placa de gel antes de ver.
	A fotografia de gel está muito clara.	Utilização de brometo de etídio em excesso. Verifique as definições da câmara.
	A fotografia de gel está muito escura.	Utilize a quantidade recomendada de brometo de etídio. Verifique as definições da câmara.
Problemas gerais com a falsa amplificação negativa ou problemas de funcionamento dependentes de tal natureza	Configuração da taxa de inclinação muito alta.	Os kits Olerup SSP são validados usando o ciclador GeneAmp 9700 definido para o modo 9600 e o ProFlex com uma taxa de inclinação de 3°C/s. Taxas de inclinação mais altas do que o equivalente podem ter um efeito sobre os resultados de tipagem.

MARCAS COMERCIAIS UTILIZADAS NESTE DOCUMENTO/PRODUTO

Olerup SSP®é uma marca comercial registada da *CareDx AB*.
Qiagen™ é uma marca registada da QIAGEN.

GARANTIA

A garantia da *CareDx AB* para com os compradores originais dos seus produtos cobre defeitos de materiais e mão-de-obra sob condições normais de utilização e funcionamento. Perante esta garantia, a única obrigação da *CareDx AB* é a de substituir, sem custos, qualquer produto que não corresponda aos padrões de desempenho referidos na folha de especificações do produto.
Esta garantia é apenas aplicável a produtos que tenham sido manuseados e armazenados de acordo com as recomendações da *CareDx AB*, não se aplicando, por isso, a efeitos resultantes de modificações, utilização incorreta ou utilização abusiva.
Todas as reclamações feitas nos termos desta garantia devem ser dirigidas à *CareDx AB* por escrito e devem fazer-se acompanhar de uma cópia do comprovativo de compra. Esta garantia substitui quaisquer outras garantias expressas e/ou implícitas, incluindo as garantias de comerciabilidade e de adequação a um determinado fim. Em nenhuma circunstância deve a *CareDx AB* ser responsável por danos acidentais ou indiretos.

Este produto não pode ser, de nenhuma forma, reformulado, reembalado ou revendido sem a autorização por escrito da *CareDx AB*, Franzéngatan 5, SE-112 51 Estocolmo, Suécia.
Todas as amostras devem ser tratadas como sendo capazes de transmitir doenças. Todo o trabalho deve ser executado usando luvas e proteção apropriada.

GARANTIA

A *CareDx AB* garante que todos os primers nas placas de tipagem *Olerup* SSP® correspondem às especificidades referidas na folha de trabalho, Tabelas de especificidade e interpretação específicas do lote do folheto informativo.

MORADAS:

Fabricante:
CareDx AB, Franzéngatan 5, SE-112 51 Estocolmo, Suécia
Tel: +46-8-508 939 00
Fax: +46-8-717 88 18
E-mail: orders-se@caredx.com
Website: http://www.labproducts.caredx.com

Distribuído por:
CareDx AB, Franzéngatan 5, SE-112 51 Estocolmo, Suécia
Tel: +46-8-508 939 00
Fax: +46-8-717 88 18
E-mail: orders-se@caredx.com
Website: http://www.labproducts.caredx.com

CareDx Lab Solutions Inc., 901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Tel: 1-877-653-7871
Fax: 610-344-7989
E-mail: orders-us@caredx.com
Website: http://www. labproducts.caredx.com

CareDx Pty Ltd., 20 Collie Street, Fremantle WA 6160, Austrália
Tel.: +61 8 9336 4212
E-mail: orders-aus@caredx.com
Website: http://www.labproducts.caredx.com

Para mais informações sobre os distribuidores CareDx a nível mundial, contacte a CareDx AB.

0413-LBL v02 Kits Olerup SSP® para tipagem HLA incluindo Taq polimerase foi traduzido a partir do original em inglês 0192-LBL v04 Olerup SSP® HLA typing kits including Taq polymerase.

Alterações na revisão 0192-LBL v04 em comparação com 0192-LBL v03:
1. Detalhes de contato revisados.

Alterações na revisão 0192-LBL v03 em comparação com 0192-LBL v02:
1. Data de revisão adicionada.
2. Informações sobre os documentos do folheto informativo específico do lote esclarecidos.
3. CareDx Pty Ltd adicionada como distribuidor.
4. Endereço para o website alterado.