

## Instruções de Utilização

### Amplificação por PCR e sequenciação de loci HLA de classe I e II

**Version No: 1.0**  
**Issue Date: Outubro 2017**

**IVD**



CareDx Pty Ltd  
20 Collie Street  
Fremantle 6160  
Western Australia  
Australia

**EC REP**

Qarad bvba  
Cipalstraat 3  
B-2440 Geel  
Belgium

# Índice

PRINCÍPIO.....	3
UTILIZAÇÃO PRETENDIDA .....	3
COMPOSIÇÃO DO KIT .....	4
EXIGÊNCIAS DE ARMAZENAMENTO .....	8
MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTO NÃO FORNECIDOS .....	8
EXIGÊNCIA QUANTO À AMOSTRA .....	10
AVISOS E PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA .....	10
SÍMBOLOS.....	11
PROCEDIMENTO.....	11
1. PCR .....	11
2. Electroforese em gel de agarose .....	12
3. Purificação do produto da PCR.....	12
4. Reacção de sequenciação .....	13
5. Purificação de produtos da reacção de sequenciação.....	15
6. Desnaturação e electroforese dos produtos da reacção de sequenciação.....	16
7. Edição e análise de electroferogramas.....	17
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO.....	17
Acurácia.....	17
Limite de detecção .....	19
Especificidade.....	19
LIMITAÇÕES E ADVERTÊNCIAS.....	19
LICENÇA.....	19
BIBLIOGRAFIA .....	20
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS .....	20
PRODUTOS RELACIONADOS .....	23
APOIO E INFORMAÇÕES PARA CONTACTO .....	24


## Princípio

O procedimento HLA Sequencing Based Typing (SBT) aqui descrito foi desenvolvido originalmente por D. Sayer em 2001<sup>1</sup> e desenvolvido dentro de único tubo de ensaio em 2004<sup>2</sup>. Os procedimentos envolvem a amplificação inicial da sequência alvo seguido por tratamento enzimático para remover iniciadores não incorporados e dNTPs. O amplicon é então utilizado como um molde para a sequenciação directa de ADN automatizada fluorescente utilizando os iniciadores de sequenciação personalizados e a química de sequenciação Big Dye® Terminator disponível da Applied Biosystems™ pela Life Technologies™. Os produtos de extensão foram purificados de acordo com o método de precipitação com etanol e desnaturado usando formamida Hi-Di™ disponível a partir da Applied Biosystems™ por Life Technologies™, antes da separação e detecção num sequenciador automático de DNA fluorescente. Recomenda-se que os dados resultantes são então analisados com ASSIGN™ SBT software de análise de sequência de CareDx Pty Ltd<sup>3-5</sup>.

## Utilização pretendida

Os kits OLERUP SBT™ para tipagem por sequenciação nucleotídica (SBT) do HLA da CareDx Pty Ltd são utilizados para a tipagem de genes HLA Classe I (HLA-A, -B, e -C) e Classe II (HLA-DRB1, -DQB1 e -DPB1) num laboratório a partir de ADN genómico. Cada kit contém reagentes que facilitam a amplificação por PCR e a sequenciação de ADN de um determinado gene. Deve notar-se que estes kits SBT não são utilizados para o diagnóstico de doenças.

## Composição do kit

Kit	Catálogo No		PRE-PCR Conteúdo† (No de frascos)	PÓS-PCR Conteúdo (No de frascos)	
<b>Class I</b>					
HLA-A	XH-PD1.1-2(20)	20 testes	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-A MIX</div>	1 x 25µL 1 x 352µL <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4R</div>	1 x 44µL cada
	XH-PD1.1-2(50)	50 testes	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-A MIX</div>	1 x 60µL 1 x 880µL <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4R</div>	1 x 110µL cada
HLA-B	BS-PD2.1-2(20)	20 testes	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-B MIX</div>	1 x 25µL 1 x 352µL <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4R</div>	1 x 44µL cada
	BS-PD2.1-2(50)	50 testes	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-B MIX</div>	1 x 60µL 1 x 880µL <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4R</div>	1 x 110µL cada

Kit	Catálogo No	Σ	PRE-PCR Conteúdo† (No de frascos)		PÓS-PCR Conteúdo (No de frascos)		
HLA-C	HH-PD 3.2-2(20)	20 testes	DNA POL – HLA-C HLA-C MIX	1 x 25µL 1 x 352µL	CEX1F CEX2F CEX3F CEX4F CEX5F CEX6F CEX7F	CEX1R CEX2R CEX3R CEX4R CEX5R CEX6R	1 x 44µL cada
	HH-PD 3.2-2(50)	50 testes	DNA POL – HLA-C HLA-C MIX	1 x 60µL 1 x 880µL	CEX1F CEX2F CEX3F CEX4F CEX5F CEX6F CEX7F	CEX1R CEX2R CEX3R CEX4R CEX5R CEX6R	1 x 110µL cada
<b>Class II</b>							
HLA-DRB1	HH-PD5.2-5(20)	20 testes	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DRB1EX2F DRB1EX3R-2	DRB1EX2R-2 RB-TG344-R	1 x 44µL cada
	HH-PD5.2-5(50)	50 testes	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DRB1EX2F DRB1EX3R-2	DRB1EX2R-2 RB-TG344-R	1 x 110µL cada

Kit	Catálogo No	Σ	PRE-PCR Conteúdo† (No de frascos)		PÓS-PCR Conteúdo (No de frascos)		
	LG-PD5.2-7(20)	20 testes	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DRB1EX2F DRB1EX3F-7 RB-TG344-R	DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-7	1 x 44µL cada
	LG-PD5.2-7(50)	50 testes	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DRB1EX2F DRB1EX3F-7 RB-TG344-R	DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-7	1 x 110µL cada
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2(20)	20 testes	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R DQB1EX3R	1 x 44µL cada
	PQ-PD6.2-2(50)	50 testes	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R DQB1EX3R	1 x 110µL cada
	AN-PD6.2-3(20)	20 testes	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 44µL cada
	AN-PD6.2-3(50)	50 testes	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 110µL cada
HLA-DPB1	HH-PD10.1(20)	20 testes	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1 x 44µL cada

Kit	Catálogo No	Σ	PRE-PCR Conteúdo† (No de frascos)		PÓS-PCR Conteúdo (No de frascos)		
	HH-PD10.1(50)	50 testes	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DPB1EX2F DPB1EX2R		1 x 110µL cada
	KD-PD10.2-1(20)	20 testes	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DPB1EX1F DPB1EX1R DPB1EX2F DPB1EX2R DPB1EX3F DPB1EX3R DPB1EX4F DPB1EX4R DPB1EX5F DPB1EX5R PB-AG341-R		1 x 44µL cada
	KD-PD10.2-1(50)	50 testes	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DPB1EX1F DPB1EX1R DPB1EX2F DPB1EX2R DPB1EX3F DPB1EX3R DPB1EX4F DPB1EX4R DPB1EX5F DPB1EX5R PB-AG341-R		1 x 110µL cada

†O kit PRE-PCR contém um recipiente de uma mistura para PCR específica para um locus (p. ex., **HLA-A MIX**) consistindo em tampão para PCR, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, e primers de PCR específicos para locus, juntamente com um único recipiente de polimerase de ADN (p. ex., **DNA POL- HLA-A**).

O kit PÓS-PCR contém primers de sequenciação (p. ex., **AEX1F**).

## Exigências de armazenamento

As embalagens PRÉ e PÓS-PCR podem ser separadas e armazenadas em congeladores designados PRÉ- e PÓS-PCR. Quando armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (a faixa de temperatura de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  é aceitável), os componentes do kit podem ser utilizados até à data de validade indicada nas embalagens externas do kit e podem tolerar até 25 ciclos de congelamento/descongelamento.

Os testes acelerados de estabilidade para os kits HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 e -DPB1 indicaram uma validade de dois anos e meio a contar da data de fabrico, quando armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Embora estejam ainda em curso os teste em tempo real, recomenda-se fortemente que estes kits NÃO sejam utilizados depois do respectivo prazo de validade.

Para manter um desempenho óptimo dos kits, os componentes do kit devem ser retirados do armazenamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e rapidamente descongelados à temperatura ambiente antes da utilização. Os componentes do kit, com excepção da polimerase, devem então ser suavemente misturados por vortex para garantir que os componentes de cada tubo sejam apropriadamente misturados após o descongelamento. Depois da utilização, os kits/componentes devem voltar imediatamente aos  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Materiais, reagentes e equipamento não fornecidos

### PCR

1. Água esterilizada
2. Pipetas electrónicas ou mecânicas e pontas resistentes a aerossóis
3. Termociclador com tampa aquecida

Estes kits foram validados utilizando-se os seguintes termocicladores: MJ Research PTC 225 DNA Engine DYAD™, Applied Biosystems™ by Life Technologies™ Veriti™ Thermal cycler, Gene Amp® PCR System 9700, e Eppendorf Mastercycler® Pro.

**A utilização de outros termocicladores com estes kits requer validação pelo utilizador.**

4. Tubos de reacção de termociclador de parede fina de 0,2 mL (tiras de 8 poços ou placas de 96 poços)  
Utilize aqueles que sejam recomendados com o seu termociclador
5. Tubos de 1,5 mL estéreis
6. Área de trabalho estéril, tal como uma câmara de segurança biológica ou câmara de fluxo laminar
7. Centrifugadora de mesa com adaptadores para placas e capacidade para atingir  $2500 \times g$
8. Misturador Vortex

### Electroforese em gel de agarose

9. Aparelho de electroforese de gel de agarose
10. Gel de agarose (grau biologia molecular) TBE a 1% contendo  $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$  de brometo de etídio.
11. Tampão de carregamento



12. Marcador para PCR adequado para a faixa 300 – 1300 pb
13. Transiluminador UV

#### **Purificação do produto da PCR**

14. ExoSAP (USB<sup>®</sup>ExoSAP-IT<sup>®</sup> Cat No 78200 para 100 reações ou Illustra<sup>™</sup> ExoProStar<sup>™</sup> Cat No US77702 para 100 reações)
15. 2 mM MgCl<sub>2</sub> (disponível para compra da CareDx Pty Ltd, código do produto MgCl<sub>2</sub>-1.0(50) ou MgCl<sub>2</sub>-1.0(3000))
16. Agitador

**A utilização de técnicas alternativas de purificação PCR requer a validação pelo utilizador antes da utilização.**

#### **Reacção de sequenciação**

17. BigDye<sup>®</sup> Kit terminador ciclo de sequenciação v3.1 ou v1.1, Applied Biosystems<sup>™</sup> by Life Technologies<sup>™</sup>
18. Tampão de reacção de sequenciação 5x (CareDx Pty Ltd, código do produto SEQ BUF-2.0(400) ou SEQ BUF-2.0(5000)) ou BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 ou v1.1 tampão de sequenciação 5X, Applied Biosystems<sup>™</sup> da Life Technologies<sup>™</sup>

#### **Purificação de produtos da reacção de sequenciação**

19. EDTA 125 mM, pH 8,0 (disponível para compra da CareDx Pty Ltd, código do produto EDTA-3.0(200) ou EDTA-3.0(5000))
20. Etanol absoluto e a 80%. Cada teste requer etanol a 80% acabado de preparar, consistindo em etanol absoluto e água esterilizada. **NÃO UTILIZAR ETANOL DESNATURADO** (também conhecido como espíritos metilados em alguns países)

**A utilização de técnicas alternativas de purificação de sequenciação requer a validação pelo utilizador antes da utilização.**

#### **Desnaturação e electroforese dos produtos da reacção de sequenciação**

21. Formamida Hi-Di<sup>™</sup>, Applied Biosystems<sup>™</sup> por Life Technologies<sup>™</sup>, código de produto 4311320
22. Sequenciador automático de ADN e acessórios (p. ex., Applied Biosystems<sup>™</sup> por Life Technologies<sup>™</sup> ABI Prism<sup>®</sup> 3730), incluindo recolha de dados e software  
Estes kits foram testados e validados nos sequenciadores capilares e software da Applied Biosystems<sup>™</sup> por Life Technologies<sup>™</sup> 3100, 3730 and 3730xl

**A utilização de outras técnicas de desnaturação e plataformas requer a validação pelo utilizador antes da utilização.**

23. Software de análise de sequenciação HLA (p.ex., ASSIGN<sup>™</sup> SBT, versão 3.6+ ou superior CareDx Pty Ltd)

## Exigência quanto à amostra

1. Água esterilizada (negativa/controlo de ausência de molde)
2. ADN genómico humano de elevado peso molecular (faixa de concentração 20-100 ng/μL em tampão Tris/EDTA e  $DO_{260/280} > 1,8$ ) extraído de amostras de sangue total com anticoagulante ACD ou EDTA. NÃO utilizar amostras de sangue total contendo heparina.

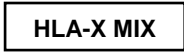





## Avisos e precauções de segurança

- Este kit deve ser utilizado por pessoal de laboratório formado e autorizado.
- Todas as amostras, equipamento e reagentes devem ser manuseados de acordo com as boas práticas de laboratório. Em particular, todo o material proveniente de doentes deve ser considerado como potencialmente infeccioso. A utilização de luvas e batas de laboratório é fortemente recomendada. Manusear e eliminar todo o material de amostras de acordo com as orientações regulamentares locais e nacionais.
- NÃO existem substâncias perigosas em nenhum dos componentes do kit.
- NÃO utilizar os reagentes após o prazo de validade.
- NÃO é recomendada a utilização de componentes de kit de diferentes lotes de kit. Esse tipo de utilização pode afectar o desempenho do ensaio.
- NÃO é recomendada a utilização de reagentes não incluídos neste kit ou listados em “Material, reagentes e equipamento não fornecidos neste kit” (p. ex., *Taq* ADN polimerases alternativas). Esse tipo de utilização pode afectar o desempenho do ensaio.
- Devem tomar-se os cuidados adequados para evitar a contaminação cruzada de amostras de ADN. Mudar as pontas entre amostras de ADN sempre que possível.
- As actividades Pré- e Pós-PCR devem ser separadas fisicamente de forma estrita. Utilizar equipamento, reagentes e batas de laboratório especificamente concebidos.
- O brometo de etídio é um cancerígeno potencial. Devem sempre ser utilizadas luvas quando se preparam e manuseiam geles. Eliminar os geles e tampões de brometo de etídio de acordo com as orientações locais e nacionais.
- Ao visualizar e fotografar geles de agarose sob luz UV, evitar sempre a exposição directa e utilizar protecções de rosto para bloqueio de UV, luvas descartáveis e batas de laboratório.

## Símbolos


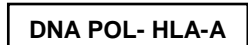
Foram utilizados os seguintes símbolos não padronizados:

Símbolo	Descrição
	Locus específico para Mix PCR
	Polimerase de ADN
	Primer de sequenciação forward (5'- 3') de exão 1 HLA-A Consultar “Composição do kit” e o Quadro 4 quanto a outros primers de sequenciação.
	Data de fabrico (exigido para mercados fora da UE).

## Procedimento

### 1. PCR

- 1.1. Deverá ser montada uma reacção PCR separada para cada locus a ser amplificado e para cada amostra individual a ser testada. Cada análise deve incluir controlo(s) positivo(s) apropriado(s) de genótipo conhecido e pelo menos um controlo negativo para cada locus que está a ser amplificado.
- 1.2. Preparar uma solução fresca de master mix PCR a cada vez que for realizada uma PCR. Descongelar rapidamente a mistura de PCR específica para o locus até à temperatura ambiente. Depois de descongelada, misturar brevemente por vortex.
- 1.3. Aplicar a quantidade necessária de mix PCR e polimerase de ADN num tubo estéril para o número de amostras a serem testadas (consultar o Quadro 1 a seguir relativamente ao volume por reacção). Passar a solução pelo vortex 3 a 4 vezes.

Locus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Mix PCR específica para o locus p. ex, 	16µL	16µL	16µL	16,7µL	16,7µL	16,7µL
Polimerase de AND p. ex, 	1µL	1µL	1µL	0,3µL	0,3µL	0,3µL

#### **Quadro 1: Composição da master mix necessária por amostra.**

- 1.4. Aplicar 17µL da master mix em cada poço de reacção.
- 1.5. Adicionar 3µL de amostra de ADN ou de controlos positivos apropriados a cada poço de reacção. Adicionar 3µL de água estéril ao poço de reacção do controlo negativo.
- 1.6. Fechar os poços de reacção. Misturar suavemente no vortex e centrifugar brevemente.
- 1.7. Colocar os poços de reacção num termociclador e executar de acordo com as condições de termociclagem a seguir.

95°C - 10 min  
 96°C - 20 seg } 33 ciclos  
 60°C - 30 seg }  
 72°C - 3 min }  
 15°C - manter

1.8. A amplificação demora aproximadamente 2,5 horas a ser concluída.

1.9. Quando a PCR estiver concluída, retirar os poços/placa de reacção do termociclador e continuar directamente para a electroforese em gel ou armazenar a 4°C até à utilização.

**OBSERVAÇÃO:** A purificação de amplicões por tratamento ExoSap deve ter lugar num prazo de 24 horas após a conclusão da PCR.

## 2. Electroforese em gel de agarose

2.1. Confirmar o êxito da amplificação por electroforese em gel de agarose utilizando 2 µl de cada produto de PCR combinados a 5µL de tampão de carregamento (volumes alternativos de tampão de carregamento devem ser validados antes da utilização). É recomendada a utilização de géis de agarose a 1%.

2.2. O número e os tamanhos esperados dos amplicões resultantes irão variar conforme a locus e o genótipo da amostra. Os tamanhos esperados dos amplicões de PCR estão indicados no Quadro 2.

Locus	Tamanhos de banda esperados	
HLA-A	≈ 2 kbp	
HLA-B	≈ 2 kbp	
HLA-C	≈ 1.1 kbp and 1.4 kbp	
HLA-DRB1	≈ 450 bp - 850bp	(HH-PD5.2-5)
	≈630 bp - 980bp	(LG-PD5.2-7)
	O padrão de bandas irá variar dependendo da presença de grupos de alelos específicos	
HLA-DQB1	≈ 300 bp and 500 bp	(PQ-PD6.2-2)
	≈400 bp and 500bp	(AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	≈400 bp	(HH-PD10.1)
	≈400 bp, ≈780 bp and ≈1470 bp	(KD-PD10.2-1)

**Quadro 2: Tamanhos esperados de produtos para cada ensaio.**

## 3. Purificação do produto da PCR

**OBSERVAÇÃO:** podem ser utilizados sistemas de purificação que não sejam ExoSAP-IT® ou ExoProSTAR™ (p.ex, Agencourt® AMPure® XP ou sistemas baseados em colunas para purificar estes produtos de PCR. É fortemente recomendado que os utilizadores validem estes

procedimentos antes de continuar. Se for utilizado EXOSAP, recomenda-se que os utilizadores sigam o procedimento descrito a seguir.

- 3.1. Preparar uma mastermix consistindo em 4 µL de ExoSAP-IT® ou ExoProStar™ e 8µL de MgCl<sub>2</sub> 2 mM por amostra a ser purificada. Misturar suavemente por vortex. Aplicar 12µL da mastermix no poço de reacção de cada amostra reactiva. Fechar os poços, misturar por vortex e colocar num agitador ou misturar suavemente por vortex durante 2 minutos. Centrifugar brevemente antes de colocar no termociclador. Utilizar o termociclador conforme o seguinte perfil:

37°C – 30 min  
80°C – 15 min  
4°C - manter

- 3.2. Após a conclusão, diluir o produto purificado a 1:4 com água estéril. Esta etapa de diluição garantirá que existe molde suficiente para efectuar as reacções de sequenciação e que a concentração do molde é suficiente para produzir dados de sequência de boa qualidade.

**OBSERVAÇÃO:** Um factor de diluição mais elevado (p. ex., 1:8) pode ser necessário caso sejam observados consistentemente sinais elevados e ruído e artefactos associados. Os produtos de PCR mais fracos podem exigir um factor de diluição mais baixo.

- 3.3. As amostras tratadas com ExoSAP podem ser armazenadas a 4°C durante até uma semana antes da utilização, mas devem ser armazenadas a –20°C para conservação de longo prazo.

## 4. Reacção de sequenciação

**OBSERVAÇÃO:** Em casos em que devam ser resolvidas ambiguidades heterozigóticas com primers hemizogotos tais como HARPS®. Consultar as instruções de utilização do OLERUP SBT™ HARPS®.

- 4.1. Quadro 3: Lista dos primers de sequenciação que devem ser utilizados para cada locu

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
AEX1F	AEX1R	BEX1F	BEX2F	CEX1F	CEX1R
AEX2F	AEX2R	BEX2R	BEX3F	CEX2F	CEX2R
AEX3F	AEX3R	BEX3R	BEX4F	CEX3F	CEX3R
AEX4F	AEX4R	BEX4R		CEX4F	CEX4R
				CEX5F	CEX5R
				CEX6F	CEX6R
				CEX7F	
HLA-DRB1 <sup>†</sup>		HLA-DQB1		HLA-DPB1	
DRB1EX2F	DRB1EX2R-2	DQB1EX2F	DQB1EX2R	DPB1EX2F	DPB1EX2R
DRB1EX3R-2 <sup>^</sup>	RB-TG344-R <sup>†</sup>	DQB1EX3F	DQB1EX3R		
Ou		Ou		Ou	

DRB1EX2F	DRB1EX2R-2	DQB1EX2F	DQB1EX2R-3	DPB1EX1F	DPB1EX1R
DRB1EX3F-7	DRB1EX3R-7	DQB1EX3F	DQB1EX3R	DPB1EX2F	DPB1EX2R
RB-TG344-R†				DPB1EX3F	DPB1EX3R
				DPB1EX4F	DPB1EX4R
				DPB1EX5F	DPB1EX5R
				PB-AG341-R*	

## Quadro 2: Lista dos primers que devem ser utilizados para cada locu.

† RB-TG344-R é um HARP® direcionado para o codão 86 em dimorfismo. Seu uso é opcional.

\* PB-AG341-R é um HARP® direcionado para o codão 85 em dimorfismo DPB1. Seu uso também é opcional.

^ DRB1 EX3R-2 é um iniciador de sequenciação DRB1 nos kits HH-PD5.2-5 que comporta semelhante a um HARP e é concebido para sequenciar os seguintes grupos de alelos: 03 \*, 08 \*, 11 \*, 12 \*, 13 \*, 14 \*, 15 \* e 16 \*.

Estes iniciadores vão produzir tanto heterozigotos, homozigotos, ou nenhum dados de sequenciamento dependendo do genótipo da amostra que está sendo digitado. Ao analisar os dados DRB1 EX3R-2 em ASSIGN™ contra a referência DRB1-FullX2, os dados de exões 3 resultantes serão analisados em uma camada separada e vai permitir a resolução de um número de ambiguidades de alelos do exão 3, tal como o DRB1 \* 14: 01 vs \* 14: 54 ambiguidade. O seu uso é opcional, dependendo da estratégia utilizada pelo laboratório para tipagem. Isto não é aplicável para os kits de LG-PD5.2-7 como sequenciação bidireccional para exão 3 está disponível

4.2. Preparar uma solução fresca de mix para primer de sequenciação a cada vez que for realizada uma reacção de sequenciação. A composição e os volumes para o mix estão indicados por amostra.

Componente	Volume
Primer de sequenciação	2µL
Água esteril	11,5µL
BigDye® Terminators	1µL
5xSeqRxnTampão	3,5µL

4.3. Misturar cada mix de reacção de sequenciação suavemente por vortex de pulsação.

4.4. Aplicar 18µL do mix de reacção de sequenciação a cada tubo/poço de reacção apropriado.

**OBSERVAÇÃO:** para testes que envolvem poucas amostras com muitos primers de sequenciação, é aceitável aplicar o primer de sequenciação (2µL) directamente nos poços de reacção individuais. Pode então ser criada uma mastermix composta por água esterilizada, terminadores BigDye® e tampão Seq Rxn 5x, da qual 16µL devem ser aplicados em cada poço de reacção. É fortemente recomendado que a utilização deste procedimento alternativo seja validada pelo utilizador antes da respectiva implementação.

4.5. Adicionar 2µL de produto de PCR purificado a cada poço apropriado.

**OBSERVAÇÃO:** Devem tomar-se os cuidados adequados para evitar a contaminação cruzada das reacções de sequenciação.

4.6. Fechar os poços de reacção, misturar suavemente e centrifugar brevemente para garantir que o conteúdo se encontre na base da cada poço de reacção.

4.7. Colocar os tubos de reacção num termociclador e executar de acordo com o seguinte perfil:

<b>Número de ciclos</b>	<b>Temperatura e tempo</b>
25	96°C – 10seg 50°C –5seg 60°C –2min
1	4°C - manter

4.8. Depois de concluído o programa, remover os poços/placa de reacção do termociclador e continuar directamente para a purificação dos produtos da reacção ou armazenar no escuro a 4 °C até à utilização. Recomenda-se que as amostras sejam purificadas e corridas no sequenciador de ADN num prazo de 24 horas.

## 5. Purificação de produtos da reacção de sequenciação

**OBSERVAÇÃO:** A purificação de produtos da reacção pode ser levada a cabo por procedimentos que não sejam o método de precipitação por etanol aqui descrito. É fortemente recomendado que os utilizadores validem estes procedimentos antes de continuar.

- 5.1. Centrifugar brevemente os poços/placa de reacção antes de prosseguir. Caso tenham sido utilizadas tampas/coberturas durante a termociclagem, rotulá-las para evitar a contaminação cruzada.
- 5.2. Remover cuidadosamente o fecho.
- 5.3. Adicionar a cada tubo de reacção 5µL 125 mM EDTA, pH8,0. Certificar-se de que o EDTA alcança a base do tubo de reacção.
- 5.4. Adicionar 60µL de etanol a 100% a cada tubo de reacção. Fechar os poços/placa e misturar breve mas totalmente para garantir uma mistura completa.
- 5.5. Sedimentar os produtos de extensão centrifugando a 2000 g durante 45 minutos. **PASSAR IMEDIATAMENTE PARA A ETAPA SEGUINTE.** Caso isto não seja possível, voltar a centrifugar por mais 10 minutos antes de continuar.
- 5.6. Remover os fechos dos poços de reacção e eliminar o sobrenadante invertendo os poços de reacção sobre papel ou lenços absorventes.
- 5.7. Colocar os poços de reacção invertidos e o papel ou lenços no centrifugadora. Centrifugar a 350g durante 1 minuto para remover qualquer sobrenadante residual.
- 5.8. Remover os poços de reacção da centrifugadora e colocá-los em posição vertical na bancada de trabalho. Eliminar o papel ou lenços.
- 5.9. Preparar solução fresca de etanol a 80% utilizando etanol absoluto e água esterilizada.
- 5.10. Adicionar 60µL de etanol a 80% a cada poço. Voltar a fechar os poços e misturar brevemente por vortex.
- 5.11. Centrifugar a 2000g durante 5 min.
- 5.12. Repetir as etapas 5.6 e 5.7.

- 5.13. Retirar os tubos de reacção da centrifugadora e eliminar o papel absorvente. Voltar a fechar os poços de reacção e prosseguir para a etapa de desnaturação. Caso contrário, armazenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  no escuro. Recomenda-se que os produtos de extensão sejam corridos no sequenciador de ADN num prazo de 24 horas a contar do início das reacções de sequenciação.

## 6. Desnaturação e electroforese dos produtos da reacção de sequenciação

**OBSERVAÇÃO:** O procedimento para a desnaturação dos produtos de extensão em formamida Hi-Di™ aqui descritos podem não ser necessários caso tenham sido utilizados procedimentos de purificação que não a precipitação por etanol. Recomenda-se fortemente que os utilizadores validem os procedimentos alternativos antes de prosseguir.

- 6.1. Adicionar 12 $\mu\text{L}$  de Formamida Hi-Di™ a cada tubo de reacção. Misturar por vortex e centrifugar os poços/placa brevemente.
- 6.2. Incubar os poços de reacção a 98 $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Após a incubação, certificar-se de que os poços sejam rapidamente arrefecidos à temperatura ambiente (p. ex., colocar em gelo ou utilizar o termociclador para efectuar as etapas de desnaturação e arrefecimento) antes de serem colocados no sequenciador. Caso não seja possível correr as amostras imediatamente, armazenar a 4 $^{\circ}\text{C}$  até utilização.

**OBSERVAÇÃO:** Certificar-se de que não existem bolhas de ar nos poços de reacção. Estas podem ocorrer e perturbar a capilaridade.

- 6.3. Carregar os poços de reacção/placa no sequenciador automático e preparar o ficheiro de recolha de dados conforme as especificações do fabricante do sequenciador.
- 6.4. Os seguintes parâmetros de aparelho foram validados pelo fabricante utilizando o kit de sequenciação terminador Big Dye® v3.1 e POP-7™. Estes parâmetros podem requerer a validação por parte do utilizador para outros polímeros, químicos da sequenciação e aparelhos. Consulte o Manual do Utilizador apropriado do aparelho para obter instruções detalhadas e orientação (p. ex., certificar-se de que a preparação do conjunto de corantes é apropriada para os químicos utilizados, por exemplo, os químicos de sequenciação de terminador v1.1 Big Dye® exigem um conjunto de corantes diferente).

<u>Parâmetro</u>	<u>Configuração</u>
Dyeset (Conjunto de corantes)	Z_BigDyeV3
Mobility file (Ficheiro mobilidade)	KB_3730_POP7_BDTV3
Basecaller (Identificador de base)	KB.bcp
Run Module (Módulo de execução)	Regular FastSeq50_POP7
Injection time (Tempo de injeção)	15 seg
Run time (Tempo de corrida)	3000 seg

- 6.5. Utilizar o software de recolha de dados do aparelho para processar os dados brutos e criar os ficheiros de sequência. Consultar o Manual do Utilizador apropriado do aparelho para obter instruções detalhadas e orientação.



## 7. Edição e análise de electroferogramas

Os kits OLERUP SBT™ foram desenvolvidos e validados utilizando-se o software OLERUP ASSIGN™ SBT, desenvolvido pela CareDx Pty Ltd. Recomenda-se que os utilizadores utilizem ASSIGN SBT 3.6+ ou maiores, visto que estas versões do software utilizam ficheiros de configuração e referência especificamente concebidos para os kits de tipagem OLERUP SBT™ e HARPS®. Para mais detalhes relativamente ao funcionamento deste software, queira consultar os manuais do utilizador pertinentes disponíveis para transferência no sítio da Olerup (<http://www.olerup.com>).

Os dados de sequenciamento baseado na tipagem gerados usando os kits de tipagem OLERUP SBT™ devem ser analisado contra os seguintes arquivos de referência ASSIGN™ que são fornecidos por CareDx Pty Ltd:

Ensaio	Código do Produto	Atribuir referência do arquivo
OLERUP SBT™ HLA-A	XH-PD1.1-2	A.xml
OLERUP SBT™ HLA-B	BS-PD2.1-2	B.xml
OLERUP SBT™ HLA-C	HH-PD3.2-2	C.xml o Cw.xml
OLERUP SBT™ HLA-DRB1	HH-PD5.2-5	DRB1-FullX2.xml
	LG-PD5.2-7	527_DRB1.xml
OLERUP SBT™ HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2	DQB1.xml
	AN-PD6.2-3	623_DQB1.xml
OLERUP SBT™ HLA-DPB1	HH-PD10.1	DPB1.xml
	KD-PD10.2-1	DPB1.xml

## Características de desempenho

### Acurácia

Painéis de até 93 amostras do programa de ensaios de proficiência UCLA Internacional DNA Exchange (2008- 2010) usado para testes internos para os kits OLERUP SBT™ forneceu os seguintes resultados:

Locus	Num de amostras testadas	Diagnostico sensibilidade (%PCRs bem-sucedidos)	Diagnostico especificidade (% dos genotipos obtidos)	Num de amostras discordantes	Num de heterozigotos	Num de alelos únicos
HLA-A	81	100%	100%	0	74	20
HLA-B	82	100%	98.8%	0	79	81
HLA-C	39	97.5%	97.5%	0	35	21
HLA-DRB1	93	96.7%	96.7%	0	84	39
HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2)	42	100%	100%	0	36	14

<b>Locus</b>	<b>Num de amostras testadas</b>	<b>Diagnostico sensibilidade (%PCRs bem sucedidos)</b>	<b>Diagnostico especificidade (% dos genotipos obtidos)</b>	<b>Num de amostras discordantes</b>	<b>Num de heterozigotos</b>	<b>Num de alelos únicos</b>
HLA-DQB1 (AN-PD6.2-3)	38	100%	100%	0	34	15
HLA-DPB1 (HH-PD10.1)	77	100%	100%	0	60	18
HLA-DPB1 (KD-PD10.2-1)	16	100%	100%	2*	14	13

\*As duas amostras discordantes continham informações sequência adicional fora exão 2 que não foi relatado pelo programa de ensaios de proficiência UCLA Internacional DNA Exchange. Uma amostra continha 131:01, mas foi relatado como 13:01 pelo programa de ensaios de proficiência UCLA Internacional DNA Exchange. Os alelos diferem em exons 3 e 4. A outra amostra continha 107:01, mas foi relatado como 13:01 pelo programa de ensaios de proficiência UCLA Internacional DNA Exchange. Estes diferem de alelos do exão 1.

Para os kits de HLA-DRB1 OLERUP SBT™ (código de produto LG-PD5.2-7), um painel de 23 amostras bem caracterizadas, que abrangem uma ampla gama de alelos foi utilizado para testes internos. Além disso, um painel de 293 amostras provenientes externamente também foram tipificadas sem um conhecimento a priori de outros dados de tipagem de HLA. Essas amostras também foram testadas com o ensaio HLA-DQB1 OLERUP SBT™ (PQ-PD6.2-2). Nos casos em que um resultado homocigótico foi obtido, as associações DQB1 / DRB1 para essas amostras foram analisadas para confirmar o resultado, bem como para detectar as onde a-gota alelo possam ter ocorrido.

O teste produziu os seguintes resultados:

<b>Locus</b>	<b>Num de amostras testadas</b>	<b>Diagnostico sensibilidade (%PCRs bem sucedidos)</b>	<b>Diagnostico especificidade (% dos genotipos obtidos)</b>	<b>Num de amostras discordantes</b>	<b>Num de heterozigotos</b>	<b>Num de alelos únicos</b>
HLA-DRB1	23	100%	100%	0	23	12
	286*	97,9%	99,6%	0	253	33

\* Seis amostras falharam para amplificar amostras de DNA devido a qualidade pobre. Uma amostra foi encontrado contendo ADN contaminante, a fonte que ocorreu no laboratório a partir da qual foram obtidas as amostras. Como resultado da contaminação, obteve-se um genótipo que não poderia ser obtido para essa amostra.

A análise de sequência de PCR e sites de iniciador de sequenciação e de avaliação de desempenho não identificaram nenhum alelo comum e bem documentados que não foram amplificadas através da utilização recomendada desses kits. Para mais informações, consulte o documento OLERUP SBT™ Primer disponível com cada liberação de referência OLERUP ASSIGN™ SBT, download no site da Olerup (<http://www.olerup.com>)

## Limite de detecção

A concentração recomendada de ADN genómico humano de alto peso molecular é de 20-100 ng/μL. Os testes internos mostraram que amostras com concentrações tão baixas quanto 5 ng/μL também podem ser utilizadas. São também obtidos génotipos correctos a partir de ADN de baixa qualidade ou rompido.

## Especificidade

Os kits CareDx Pty Ltd's OLERUP SBT™ são ensaios específicos para locus. A utilização destes kits de acordo com estas instruções deverá amplificar um locus único. Na maioria dos casos, a utilização de primers de sequenciação em cada kit irá produzir uma tipagem de HLA para a maioria das amostras, sem a necessidade de resolução anterior. Nos casos em que continuam a existir ambiguidades heterozigóticas, é recomendada a utilização de primers de resolução de sequenciação (como OLERUP SBT™ HARPS®).

Deve notar-se que são possíveis mutações nos locais de mutação ou de primer de sequenciação e que estas podem resultar em exclusão de alelos. As amostras que sugerem um resultado de tipagem homozigótico devem ser confirmadas por procedimentos alternativos.

## Limitações e advertências

- É fortemente recomendado que estes kits sejam validados pelo utilizador antes da implementação em laboratório, utilizando amostras cujo tipo de HLA tenha sido determinado por outros procedimentos moleculares. Em particular, quaisquer desvios deste procedimento (p. ex., a utilização de procedimentos alternativos de PCR ou sequenciação de ADN) devem ser validados pelo utilizador antes da respectiva implementação.
- Estes kits foram validados utilizando-se painéis de amostras cujos génotipos abrangem uma ampla gama de alelos. No entanto, deve-se notar que podem ser encontrados alelos raros e alelos com polimorfismos em locais de amplificação e de primers de sequenciação e que estes podem não ser amplificados ou sequenciados.
- A natureza da tipagem por sequenciação nucleotídica de HLA é tal que outros factores, além do mix PCR, podem resultar em amplificação preferencial ou exclusão de alelo. Consequentemente, os resultados de tipagem homozigótica aparente devem ser confirmados por métodos alternativos e/ou genotipagem familiar.
- Um controlo positivo (ADN humano) e um controlo negativo (água estéril) devem ser incluídos em cada corrida de PCR. O controlo positivo deve produzir um produto de PCR com o tamanho apropriado, dependendo do locus amplificado e a sequência resultante deve estar em concordância com o génotipo da amostra. Não devem existir produtos de PCR no controlo de molde negativo para todos os ensaios. Caso seja visível uma banda, poderá ter ocorrido contaminação em algum nível e a corrida deve ser repetida.
- Ocasionalmente, poderão ser visíveis produtos de PCR maiores e mais fracos. Estas bandas adicionais não interferem com os resultados ou a qualidade da sequência.

## Licença

Os kits OLERUP SBT™ contêm GoTaq® Hot Start Polymerase (DNA POL), fabricada pela Promega Corporation para distribuição pela CareDx Pty Ltd. com licença da Promega com os números de patente EUA 5,338,671 e 5,587,287 e correspondentes patentes estrangeiras.

## Bibliografia

1. Sayer D, Whidborne R, Brestovac B, Trimboli F, Witt C, Christiansen F (2001): *HLA-DRB1 DNA sequencing based typing: an approach suitable for high throughput typing including unrelated bone marrow registry donors*. *Tissue Antigens* **57**: 46-54.
2. Sayer D, Whidborne R, DeSantis D, Rozemuller EH, Christiansen F, Tilanus MG (2004). *A multicentre international evaluation of single-tube amplification protocols for sequencing-based typing of HLA-DRB1 and HLA-DRB3, 4, 5*. *Tissue Antigens* **63**: 412-423.
3. *ASSIGN™ SBT v3.6+ Operator Manual*, CareDx Pty Ltd
4. *ASSIGN™ SBT v4.7 Operator Manual*, CareDx Pty Ltd
5. *OLERUP ASSIGN™ SBT v471 Operator Manual*, CareDx Pty Ltd
6. Mais informações sobre o Programa de Troca de DNA UCLA podem ser encontradas em: <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm>.
7. Alelos HLA atuais podem ser encontradas em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.

## Resolução de problemas

Problema	Causa ou causas possíveis	Solução
Nenhum produto de PCR ou produto fraco	ADN de baixa qualidade	Avaliar a qualidade do ADN por electroforese em gel. O ADN intacto deve ter aprox. 3 kb, com pouco ou nenhum sinal de borrão no gel. Voltar a extrair o ADN e repetir a PCR quando possível.
	Quantidade insuficiente de ADN aplicada à PCR.	Verificar se a concentração de ADN está entre 20-100 ng/μl. Voltar a extrair o ADN e repetir a PCR quando possível.
	Presença de inibidores da PCR em ADN genómico	Evitar a utilização de amostras de sangue total contendo heparina. Voltar a extrair o ADN e repetir a PCR quando possível.
	Não foi adicionada quantidade suficiente de mastermix ou a mistura da mastermix antes da adição das amostras foi insuficiente.	Repetir a PCR. Certificar-se de que os componentes da mastermix são adicionados e suficientemente misturados por vortex.
	Problemas no termociclo	Verificar os parâmetros do termociclador. Verificar o registro do teste para garantir que este não foi terminado de forma prematura. Certificar-se de que o termociclador está a funcionar de acordo com as

<b>Problema</b>	<b>Causa ou causas possíveis</b>	<b>Solução</b>
		especificações do fabricante e é submetido a manutenções regulares.
	Não foi adicionado brometo de etídio ao gel.	Submerger o gel num banho de coloração contendo TBE 1X com 0,5mg/ml de brometo de etídio. Descolorar em TBE 1X antes de obter a imagem do gel. Certificar-se que o brometo de etídio é adicionado ao gel antes de verter.
	As amostras de ADN são eluídos ou diluído em água que pode ter um pH ligeiramente ácido.	Sempre que possível, o uso de água estéril com um pH neutro.
Nenhum produto de PCR ou produto fraco para a banda exão 3-5 para o ensaio KD-PD 10,2-1	DNA qualidade pobre	Amplificação de amostras de muito má qualidade pode resultar em amplificação fraca do exão 3-5. Tipagem ainda pode ser conseguida utilizando o exão 1 e 2 da sequência de dados. Outra alternativa re-extrair DNA e repetir PCR sempre que possível.
Tamanhos de bandas incorrectos	Kit incorrecto utilizado	Verificar que é utilizado o kit correcto.
	Utilização de programa de termociclagem incorrecto.	Verificar os parâmetros do termociclo.
	Contaminação da PCR	Verificar o controlo negativo quanto a sinais de contaminação. Descontaminar a área de trabalho e repetir a PCR. Repetir a PCR para identificar a fonte de contaminação. Ponderar utilizar um kit novo. Se o ADN genómico de uma amostra parecer estar contaminado, voltar a extrair ou obter uma fonte alternativa de ADN.
Fraca intensidade de sinal de electroferogramas	Produto de PCR fraco	Verificar a imagem do gel. NÃO se recomenda sequenciar bandas de PCR fracas, visto que a qualidade da sequência pode ser insuficiente para SBT. Ponderar utilizar um factor de diluição mais baixo (p. ex., 1:2, 1:3) após a purificação da PCR.

<b>Problema</b>	<b>Causa ou causas possíveis</b>	<b>Solução</b>
	Produtos de reacção insuficientes aplicados ao sequenciador.	Verificar os parâmetros do sequenciador. Pode ser necessário aumentar o tempo de injeção e a tensão.
	Problemas durante a purificação de produtos do sequenciador	Ter o máximo cuidado ao eliminar o sobrenadante pois pode-se deslocar o sedimento.
A intensidade do sinal é excessivamente elevada (presença de picos de fluorescência elevada – artefactos)	Excesso de produto de PCR	Verificar a imagem do gel. Ponderar utilizar um factor de diluição mais elevado após a purificação da PCR. Verificar a quantidade de polimerase de ADN utilizada na PCR.
	Excesso de produtos de reacção aplicados ao sequenciador.	Verificar os parâmetros do aparelho. Ponderar reduzir o tempo de injeção e a tensão.
Baseline com ruído (ruído de fundo elevado)	Produto da PCR contaminado	Consultar as acções correctivas listadas acima.
	Amplificação de genes HLA intimamente relacionados	Verificar os parâmetros do termociclo.
	Purificação insuficiente da PCR	Assegurar-se de que o tratamento ExoSAP é levado a cabo de acordo com as instruções do utilizador do kit. Certificar-se de que a mistura PCR é totalmente misturada com ExoSAP. Ponderar utilizar ExoSAP seguindo o procedimento dos fabricantes (aumentar a quantidade de enzima), ou ponderar utilizar uma técnica de purificação alternativa.
	Reacções de sequenciação contaminadas	Certificar-se de que são tomadas todas as medidas para evitar a contaminação cruzada. Mudar as pontas das pipetas sempre que possível. Adicionar líquidos ao topo dos poços de reacção. Evitar aerossóis.
	Primer de sequenciação contaminado	Verificar a qualidade da sequência dos outros primers de sequenciação e outras amostras utilizando o mesmo primer. Ponderar utilizar uma alíquota fresca de primer de sequenciação.

<b>Problema</b>	<b>Causa ou causas possíveis</b>	<b>Solução</b>
	Mix de terminador corante ou tampão de sequenciação contaminados	Repetir a sequenciação com uma fracção fresca de reagentes.
	Purificação insatisfatória de produtos de sequenciação.	Repetir a sequenciação e certificar-se de que a purificação é realizada de acordo com as instruções do fabricante.
Presença de manchas de corante	Purificação insatisfatória de produtos de sequenciação	Purificar os produtos de acordo com as instruções do kit. Certificar-se de que os produtos são suficientemente lavados com etanol a 80%.

## **Produtos relacionados**

Diagnóstico *in vitro* com marcação CE:

ASSIGN™ SBT V3.6+                      Código do produto: CGX0036+

ASSIGN™ SBT V4.7                      Código do produto: CGX00470

OLERUP ASSIGN™ SBT V471      Código do produto: CGX00471

### **OLERUP SBT™ HARPS®**

Instruções de Utilização – OLERUP SBT™ HARPS®

Unicamente para utilização em investigação:

#### **OLERUP SBT™**

AN-PD11.0-0(20)      OLERUP SBT™ HLA-DRB3 kit (20 e 50 testes)  
AN-PD11.0-0(50)

AN-PD12.0-0(20)      OLERUP SBT™ HLA-DRB4 kit (20 e 50 testes)  
AN-PD12.0-0(50)

AN-PD13.0-0(20)      OLERUP SBT™ HLA-DRB5 kit (20 e 50 testes)  
AN-PD13.0-0(50)

LC-PD2.9(20)              OLERUP SBT™ HLA-B57 kit (20 e 50 testes)  
LC-PD2.9(50)

## **Reagentes de laboratório de utilização geral**

MgCl<sub>2</sub> – 1.0(50)              2mM MgCl<sub>2</sub>  
MgCl<sub>2</sub> - 1.0(3000))

SEQ BUF – 2.0(400)          5x Seq Rxn Buffer  
SEQ BUF – 2.0(5000)

EDTA – 3.0(200)              125mM EDTA, pH8.0  
EDTA – 3.0(5000)

Queira contactar o seu distribuidor local para mais detalhes.

## Apoio e informações para contacto

CareDx Pty Ltd  
PO Box 1294  
Fremantle 6959  
Western Australia  
Australia  
Tel: +61-422-863-227  
e-mail: [olerup-aus@caredx.com](mailto:olerup-aus@caredx.com)  
Sítio Internet: [www.olerup.com](http://www.olerup.com)

Para detalhes de pedidos, queira consultar o sítio da Olerup (<http://www.olerup.com>).





## Kits auto-certificados:

HH-PD3.2-2(20) HH-PD3.2-2(50)	SBT™ HLA-C kit (20 e 50 testes)
PQ-PD6.2-2(20) PQ-PD6.2-2(50) AN-PD6.2-3(20) AN-PD6.2-3(50)	SBT™ HLA-DQB1 kit (20 e 50 testes)
HH-PD10.1(20) HH-PD10.1(50) KD-PD10.2-1(20) KD-PD10.2-1(50)	SBT™ HLA-DPB1 kit (20 e 50 testes)

## Suporte e Detalhes de Contato

CareDx Pty Ltd  
PO Box 1294  
Fremantle 6959  
Western Australia  
Australia  
Tel: +61-08-9336-4212  
email: [olerup-aus@caredx.com](mailto:olerup-aus@caredx.com)  
Website: [www.olerup.com](http://www.olerup.com)

Para solicitar mais informações, por favour consulte o website Olerup(<http://www.olerup.com>).