Instruções de
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

Olerup SSP®
Instruções de utilização

Para utilização em diagnóstico *In Vitro*

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

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 reacção em cadeia pela polimerase (PCR) com base em técnicas de tipagem de DNA. Na maioria das técnicas com base na PCR, o processo de PCR é utilizado apenas na etapa de replicação do DNA-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.

PRINCIPIO 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 reacção PCR, do que primers não ligados, por DNA 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 da PCR, os fragmentos de DNA amplificados são separados por tamanho, por exemplo, através da técnica de electroforese 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 afectado por vários factores (por exemplo, erros de pipetagem, concentração reduzida de DNA, DNA de má qualidade, presença de inibidores PCR, precisão do termociclador) existe um par de primers de controlo interno incluído em todas as reacções 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 DNA humano. Na presença de um produto específico de PCR 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 Folheto informativo, todos presentes em Instruções de utilização, Informações específicas do lote e Ficha de trabalho.

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 DNA, 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 DNA (ver Programar o Termociclador).

Consulte as tabelas disponibilizadas de Especificidade e Interpretação ou a Ficha de trabalho específicas do lote, para alelos HLA específicos amplificados por cada mistura de primer.

Instruções de
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

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 - risco biológico*: todos os produtos sanguíneos devem ser tratados como potencialmente infecciosos. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer a garantia de que os produtos obtidos a partir do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos.
4. *Advertência - risco biológico*: o brometo de etídio utilizado para a marcação do DNA na electroforese em gel de agarose trata-se de uma substância cancerígena. Como tal, deve ser manuseado utilizando equipamento de protecção adequado.
5. *Atenção*: utilize protecção ocular contra a luz UV, não devendo olhar directamente para esta luz para observar ou fotografar os géis.
6. As pipetas e outro equipamento utilizado para manipulações ***pós***-PCR ***não*** devem ser utilizadas para manipulações ***pré***-PCR.
7. Consulte a Ficha de dados de segurança (http://www.olerup-ssp.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.

Instruções de
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

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 reacção de parede fina de 0,2 ml

  Nota: Os kits Olerup SSP são validados nos seguintes termocicladores.
  Rampas de aquecimento/arrefecimento recomendadas:

  - GeneAmp 9700: GeneAmp 9700definido para o modo 9600. Corresponde a uma **rampa de aquecimento/arrefecimento da amostra** com aumentos de 1.6°C/s e decréscimos de 0.8°C/s.
  - ProFlex 1x bloco de 96 poços: ProFlex PCR termociclador com uma rampa de aquecimento/arrefecimento do bloco de 3.0°C/s (cada passo 3.0°C/s). Uma **rampa de aquecimento/arrefecimento do bloco** de 3.0°C/s corresponde a rampa de aquecimento/arrefecimento da amostra com aumentos de 1.52°C/s e decréscimos de 1.36°C/s
  - ProFlex 2x bloco de 96 poços: ProFlex PCR termociclador com uma taxa de rampa do bloco de 3.0°C/s (cada passo 3.0°C/s). Uma **rampa de aquecimento/arrefecimento do bloco** de 3.0°C/s corresponde a uma rampa de aquecimento/arrefecimento da amostra com aumentos de 1.9°C/s e decréscimos de 1. 6°C/s

  Nota: Rampas de aquecimento/arrefecimento mais elevadas que o equivalente acima descrito, podem ter um efeito nos resultados da tipagem. Tenha também em atenção que a tipagem pode ser diferente entre diferentes termocicladores não-validados, dependendo das definições usadas.
- 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	menos de 8 horas
		4ºC		mais de 8 horas

Volume de reacção 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 DNA puro extraído. As amostras de DNA para utilizar na tipagem HLA por PCR-SSP devem ser novamente suspensas em dH_2O. A relação A260/A280 deve ser de 1,6 – 2,0 por espectrofotometria UV para uma visualização óptima da banda durante a electroforese.

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

Como alternativa, o DNA pode ser extraído por meio de um outro método de colheita de DNA puro. Ao utilizar métodos alternativos, a concentração de DNA deve ser ajustada para30 ng/µl. ***Não utilize sangue heparinizado com estes métodos.***

Concentração de DNA recomendada utilizando: Extracção de DNA por EZ1, 15 ng/µl. Extracção de DNA 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 DNA extraído em dH_2O.

As amostras de DNA 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 DNA devem ser utilizadas imediatamente após a extracção ou armazenadas a +4ºC durante um período máximo de 2 semanas. As amostras de DNA podem ser armazenadas a uma temperatura de -20ºC ou inferior durante um período de 9 meses. A pureza e a concentração das amostras de DNA extraído que tenham sido armazenadas durante longos períodos, devem ser testadas antes de serem utilizadas para a tipagem HLA.

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

Instruções de
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

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. Folheto informativo.

B. Materiais necessários mas não fornecidos

1. Kit/Equipamento para o isolamento do DNA
2. Espectrofotómetro 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 DNA-Mistura de PCR-dH_20 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 reacção de parede fina de 0,2 ml
10. Microondas ou placa de aquecimento para aquecer as soluções de agarose
11. Agarose de grau de electroforese, por exemplo, FMC Seakem LE
12. Tampão TBE0,5 x; Tampão TBE 1x - 98 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 DNA para determinar o tamanho de fragmentos entre 50 – 1 000 bp, por exemplo, escada padronizada em 100 pares de base, Marcador de DNA Produto N.º 103.202-100 ou Marcador de DNA para ensaios com gel 103.203-100
16. Aparelho de electroforese/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
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

A. Preparação da amostra

1. Purifique o DNA genómico a partir da amostra de leucócitos utilizando o método de eleição, consulte a secção Colheita e preparação de amostras acima.
2. Para mais informações sobre a preparação e o armazenamento de amostras, consulte a secção Colheita e preparação de amostras acima.
3. Efectue a amplificação por PCR na amostra de DNA purificada utilizando uma placa de tipagem *Olerup* SSP® ou armazene a amostra de DNA 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 acima.
2. Prepare o gel de electroforese, consulte a secção C – **Preparação da electroforese em gel** abaixo.

C. Preparação da electroforese 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 DNA 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 microondas 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 trata-se de uma substância cancerígena. Como tal, deve ser manuseado utilizando equipamento de protecção 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. Imirja 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 electroforese 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 - 2000 pares de base.

D. Procedimento passo a passo

1. Retire da(s) temperatura(s) de armazenamento indicada(s): o número adequado de amostras de DNA, a(s) placa(s) de primers e o volume de Mistura de PCR necessários para as amostras de DNA/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 DNA 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 extracção 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 microcetrífuga 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 DNA 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 microcetrífuga 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 reacção da amostra em cada um dos poços, excepto 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, incluindo *Taq* polimerase.

Instruções de
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

N.º de poços por teste	Volume da Mistura de PCR (µl)	Volume da amostra de DNA (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 DNA (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. Kits combi A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ e DPB1-DQ-DR kit de alta resolução HLA-C

- 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 microcetrífuga 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 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 DNA à temperatura ambiente à restante mistura de Mistura de PCR e dH_2O.
- Tape o tubo e leve ao agitador vortex durante 5 segundos. Coloque o tubo numa microcetrífuga 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 reacção da amostra em cada um dos poços, excepto 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 reacção 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.º
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 reacção 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 electroforese 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. Electroforese em gel

1. Depois de concluir a reacção 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 a folha PCR 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 DNA (escada padronizada em 100 pares de base, Marcador de DNA Produto N.º 103.202-100 ou Marcador de DNA para ensaios com gel 103.203-100) num poço por linha.
5. Tape a caixa de gel com a respectiva 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 nos kits HLA-A, HLA-B e HLA-C e nos kits de baixa resolução DR, nos kits de alta resolução HLA-C e DQB1 para alelos frequentes e nos kits de placa combi A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ, DPB1-DQ-DR e DQ-DR e nos kits de DQA1*02,05;DQB1*02,03:02 e HLA-B*57:01.

Consulte a secção Interpretação do gel na página 14.

RESULTADOS

Folhas de validação da linha da célula e um Certificado de análise específicos do lote são fornecidos com cada kit.

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 DNA extraída serve de modelo para o processo de amplificação específico por PCR. A relação A260/A280 do DNA purificado deve estar entre 1,6 e 2,0 para obter uma visualização óptima da banda por electroforese.

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 extracção a concentrações sem qualquer impacto para o desempenho do teste.

Método de extracção	Substância interferente	Concentração interferente*
EZ1 DSP DNA Blood System	Bilirrubina	200 mg/L
	Hemoglobina	200 g/L
	Triglicérido	30 g/L
	Proteína	110 g/L
QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirrubina	200 mg/L
	Hemoglobina	200 g/L
	Triglicérido	18,2 g/L
	Proteína	77 - 96 g/L
Gentra PureGene method	Bilirrubina	200 mg/L
	Hemoglobina	200 g/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. Confira a compatibilidade do termociclador na tabela abaixo. Esta tabela serve apenas como um guia.

Nota: Esta tabela serve apenas como um guia. Para termocicladores validados, por favor refira-se à secção Requisitos do Equipamento – Equipamento.

Instruções de
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

Tabela de compatibilidade	
Fabricante	**Termociclador**
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-well
	ProFlex 2x96-well
	Veriti 0.2ml 96-well Block
	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 with 96-well block
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

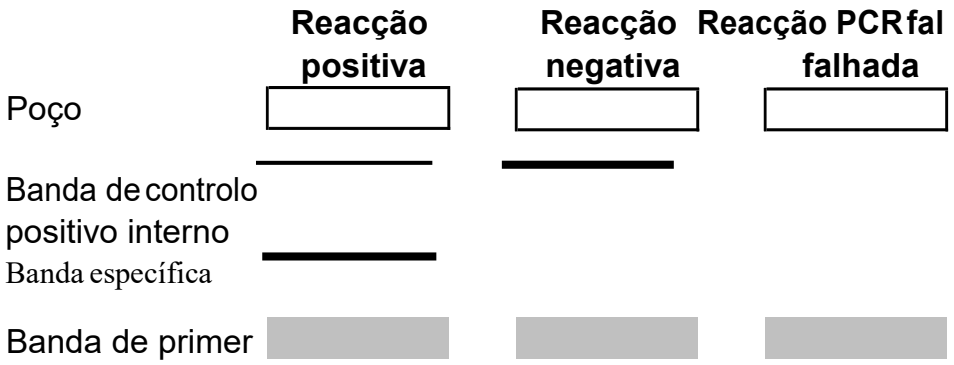
VALORES ESPERADOS

A. Análise de dados

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

1. Uma migração mais rápida, banda mais curta, será observada numa trajectória 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 trajectórias 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 DNA da amostra.
   c. Faça corresponder o padrão de trajectórias de gel com produtos de PCR específicos nas tabelas de Especificidade e Interpretação específicas do lote, para obter a tipagem HLA do DNA da amostra.
2. Deverá ser sempre visível uma banda de controlo positivo interno, de migração mais lenta e comprida, em todas as trajectórias de gel, excepto na trajectória de gel do controlo negativo, como um controlo com uma amplificação bem sucedida. A banda de controlo positivo pode estar fraca ou ausente na trajectórias 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 correcta 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 reacção de PCR falhada.
      i. Se os alelos poderem ser determinados na presença de reacções de PCR falhadas e estas mesmas reacções não alterarem a transferência de alelos, o teste não tem de ser repetido.
      ii. No entanto, se as reacções 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 trajectórias 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 trajectórias de controlo negativo. Tal não é sinónimo de contaminação.

B. Interpretação do gel



1. Um marcador de DNA (escada padronizada em 100 pares de base, Marcador de DNA Produto N.º 103.202-100 ou Marcador de DNA para ensaios com gel 103.203-100) deve integrar um poço por linha do gel ou de acordo com as directrizes 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.

CARACTERISTICAS ESPECIFICAS DE DESEMPENHO

Lote de controlo de qualidade do kit

Cada solução de primer é testada em comparação a um conjunto de 48 amostras de DNA 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 extracção de DNA foi executada e o DNA 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 Class 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 DNA bem caracterizadas, cujos resultados consensuais estão incluídos no Banco UCLA HLA DNA 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 DNA com resultados de tipagem HLA bem caracterizados.

As concordâncias inferiores observadas para os alelos de Classe II por alta definição menos investigados reflecte a maior incerteza nos "resultados consensuais" das amostras de DNA 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 (DQA1*0505 Olerup SSP® vs. "tipagem consensual" DQA1*0501) todos os três laboratórios de teste chegaram ao mesmo resultado, indicando um 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 actuais podem encontrar-se em:
   a. http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla ou
   b. http://www.anthonynolan.org.uk/HIG

Instruções de
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Problema	Motivo	Acção
Sem amplificação (nem amplificação dos fragmentos de controlo interno, nem amplificações específicas).	Quantidade insuficiente de DNA.	Meça a concentração de DNA e veja se a quantidade adicionada é a correcta. A contaminação por RNA pode causar um cálculo excessivo de espectrofotometria da concentração de DNA. Repita cuidadosamente a extracção do DNA utilizando soluções preparadas de novo Recomenda-se a extracção automática do DNA com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	O DNA contém inibidores PCR, por exemplo, proteínas, etanol (de etapas de precipitação), matrizes residuais da purificação do DNA na fase sólida.	Meça a qualidade do DNA. Recomenda-se uma relação A260/A280 de 1,6 – 2,0 por espectrofotometria UV. Siga o protocolo de extracção de DNA do fornecedor de forma exacta. Volta a extrair o DNA. Recomenda-se a extracção automática do DNA com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	O DNA foi extraído de sangue heparinizado.	Utilize sangue não heparinizado ou siga os protocolos de extracção para sangue heparinizado.
	O DNA é dissolvido num tampão contendo EDTA.	Repita a extracção do DNA e dissolva o DNA em dH_20.

Instruções de
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

Problema	Motivo	Acção
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 correcta.	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 correcto para os poços de reacção 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 correctamente colocadas vão permitir a evaporação e originar uma falha na amplificação.	Certifique-se de que todas as folhas/tampas PCR estão correctamente colocadas. 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.
	Erros na distribuição do gel	Verifique que o número correcto 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.
	A Mistura de PCR e o DNA da amostra não foram correctamente misturados antes da utilização.	Misture no agitador vortex antes de utilizar. Recomenda-se que leve ao agitador vortex após cada linha.
	Foi adicionado volume irregular da mistura DNA-Mistura de PCR aos poços.	Execute a pipetagem cuidadosamente.

Problema	Motivo	Acção
Fragmentos de controlo interno fracos.	DNA impuro.	Meça a qualidade do DNA. A relação A260/A280 deve ser de 1,6 – 2,0 por espectrofotometria UV. A contaminação por RNA pode causar um cálculo excessivo de espectrofotometria da concentração de DNA. O DNA degradado dá origem a manchas nas trajectórias de gel. Repita cuidadosamente a extracção do DNA utilizando soluções preparadas de novo. Recomenda-se a extracção automática do DNA com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Quantidade insuficiente de DNA.	Meça a concentração de DNA e ajuste para 30 ng/µl ou 15 ng/µl para DNA extraído com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. A contaminação por RNA pode causar um cálculo excessivo de espectrofotometria da concentração de DNA. O DNA degradado dá origem a manchas nas trajectórias de gel. Repita cuidadosamente a extracção do DNA utilizando soluções preparadas de novo. Recomenda-se a extracção automática do DNA com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.

Instruções de
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

Problema	Motivo	Acção
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.	Armazene a Mistura de PCR a uma temperatura de -20°C.

Amplificação não específica (escadas e manchas).	Utilização excessiva da amostra de DNA.	Meça a concentração de DNA e ajuste para 30 ng/µl ou 15 ng/µl para DNA 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.
	DNA impuro.	Todos os fragmentos maiores que o fragmento de controlo interno devem ser ignorados aquando da interpretação dos resultados obtidos. Verifique a qualidade do DNA. Volte a extrair o DNA. Recomenda-se a extracção automática do DNA 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.

Problema	Motivo	Acção
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 detectar se a iluminação UV estiver normal.
	Foi utilizada uma amostra de DNA muito pequena.	Meça a concentração de DNA e ajuste para 30 ng/µl ou 15 ng/µl para DNA 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.
Padrões de amplificação estranhos.	Foi utilizada uma Tabela de interpretação/Ficha de trabalho específica do lote incorrecta.	Verifique o número do lote do produto utilizado e a Tabela de interpretação/Ficha de trabalho.
	Ordem incorrecta na distribuição do gel.	Verifique o alinhamento das misturas e trajectórias de gel.
	O padrão de amplificação contém um falso positivo.	Veja abaixo.
	O padrão de amplificação contém um falso negativo.	Veja abaixo.

Problema	Motivo	Acção
Amplificações de falsos positivos	Contaminação do DNA.	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.
	DNA impuro.	Meça a qualidade do DNA. Siga o protocolo de extracção de DNA do fornecedor de forma exacta. Tente outros sistemas de extracção de DNA. Volta a extrair o DNA. Recomenda-se a extracção automática do DNA com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Utilização excessiva da amostra de DNA.	Meça a concentração de DNA e ajuste para 30 ng/µl ou 15 ng/µl para DNA extraído com o QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	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.

Problema	Motivo	Acção
Continuação: **Amplificações de falsos positivos**	Utilização de brometo de etídio em excesso.	Utilize a quantidade recomendada de brometo de etídio.
	Interpretação incorrecta 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 correcto da banda e as notas de rodapé.
	O padrão de amplificação contém um falso positivo.	Verifique se todas as amplificações específicas têm um tamanho incorrecto ou se um artefacto (transporte, dímero de primers) foi erradamente interpretado como uma amplificação.
	Ordem incorrecta na distribuição do gel.	Verifique o alinhamento das misturas e trajectórias de gel.
Amplificações de falsos negativos.	O termociclador não está correctamente 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 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 incorrecta na distribuição do gel.	Verifique o alinhamento das misturas e trajectórias de gel.

Problema	Motivo	Acção
Problemas gerais com o gel (géis pouco nítidos e/ou trajectórias manchadas).	Amostra de DNA degradado.	Aparece como uma mancha nas trajectórias de gel. Isole o DNA de uma amostra recente.
	Grandes falhas em poços aleatórios.	Suspensões irregulares de DNA. Certifique-se que o DNA da amostra é dissolvido antes da extracção de alíquotas. Dilua a amostra de DNA 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 cuidadosamente.
	O tampão da electroforese pode estar muito quente.	Prepare um novo tampão TBE. Execute a uma voltagem inferior.
	Foi utilizada uma percentagem incorrecta 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 incorrecta.	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 grossas.	Utilize pentes finos (4 x 1 mm).
	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.

Instruções de
Kits *Olerup* SSP® para tipagem HLA incluindo *Taq* polimerase

Problema	Motivo	Acção
Problemas gerais com falsas amplificações negativas ou problemas entre corridas, de tal natureza.	Configuração das rampas de aquecimento/arrefecimento muito elevada.	Os kits Olerup SSP são validados usando o termociclador GeneAmp 9700, definido para o modo 9600 e o ProFlex com uma rampas de aquecimento/arrefecimento de 3°C/s. Rampas de aquecimento/arrefecimento mais elevadas que as equivalentes ao descrito, podem ter efeito nos resultados da tipagem.

MARCAS COMERCIAIS UTILIZADAS NESTE DOCUMENTO/PRODUTO

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

GARANTIA

A garantia da *Olerup* SSP 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 *Olerup* SSP 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 *Olerup* SSP AB, não se aplicando, por isso, a efeitos resultantes de modificações, má utilização ou utilização abusiva.
Todas as reclamações feitas nos termos desta garantia devem ser dirigidos à *Olerup* SSP 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 propósito específico. Sob nenhuma circunstância deve a *Olerup* SSP AB ser responsável por danos acidentais ou indirectos.
Este produto não pode ser, de nenhuma forma, reformulado, reembalado ou revendido, sem a autorização por escrito da *Olerup* SSP AB, Franzengatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sweden.
Todas as amostras devem ser tratadas como sendo capazes de transmitir doenças. Todo o trabalho deve ser executado utilizando luvas e protecção apropriada.

GARANTIA

A *Olerup* SSP 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.

ENDEREÇOS:

Fabricante:
***Olerup* SSP AB**, Franzengatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sweden.
Tel.: +46-8-508 939 00
Fax: +46-8-717 88 18
E-mail: olerup-se@caredx.com
Página da web: http://www.labproducts.caredx.com

Distribuído por:
Olerup GmbH, Löwengasse 47 / 6, AT-1030 Vienna, Austria.
Tel.: +43-1-710 15 00
Fax: +43-1-710 15 00 10
E-mail: olerup-at@caredx.com
Página da web: http://www.labproducts.caredx.com

Olerup Inc., 901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Tel.: 1-877-OLERUP1
Fax: 610-344-7989
E-mail: olerup-us@caredx.com
Página da web: http://www.labproducts.caredx.com

Para informações sobre os distribuidores CareDx a nível mundial, contacte a **Olerup GmbH**.