

## **Brugsanvisning**

### **PCR-amplifikation og sekventering af HLA-klasse I- og II-loci**

**Versionsnr.: 1.0**  
**Udfærdigelsesdato: Oktober 2017**

**IVD**



CareDx Pty Ltd  
20 Collie Street  
Fremantle 6160  
Western Australia  
Australia



Qarad bvba  
Cipalstraat 3  
B-2440 Geel  
Belgium

# Indholdsfortegnelse

<b>PRINCIP</b> .....	<b>3</b>
<b>TILSIGTET ANVENDELSE</b> .....	<b>3</b>
<b>KIT-SAMMENSÆTNING</b> .....	<b>4</b>
<b>OPBEVARINGSKRAV</b> .....	<b>8</b>
<b>MATERIALER, REAGENSER OG Udstyr, DER IKKE MEDFØLGER</b> .....	<b>8</b>
<b>PRØVEKRAV</b> .....	<b>9</b>
<b>ADVARSLER OG SIKKERHEDSMÆSSIGE FORHOLDSREGLER</b> .....	<b>10</b>
<b>SYMBOLER</b> .....	<b>10</b>
<b>PROCEDURE</b> .....	<b>11</b>
1. PCR .....	11
2. AGAROSEGELELEKTROFORESE.....	12
3. OPRENSNING AF PCR-PRODUKT .....	12
4. SEKVENTERINGSREAKTION .....	13
5. OPRENSNING AF SEKVENTERINGSREAKTIONSPRODUKTER .....	15
6. DENATURERING & ELEKTROFORESE AF SEKVENTERINGSREAKTIONSPRODUKTER.....	15
7. REDIGERING OG ANALYSE AF ELEKTROFEROGRAMMER .....	16
<b>YDEEVNEKARAKTERISTIKA</b> .....	<b>17</b>
NØJAGTIGHED .....	17
DETEKTIONSGRÆNSE.....	18
SPECIFICITET .....	18
<b>BEGRÆNSNINGER OG FORHOLDSREGLER</b> .....	<b>18</b>
<b>LICENS</b> .....	<b>19</b>
<b>LITTERATURLISTE</b> .....	<b>19</b>
<b>FEJLFINDING</b> .....	<b>20</b>
<b>RELATEREDE PRODUKTER</b> .....	<b>22</b>


## Princip

Den HLA-sekvensbaserede typebestemmelses (SBT)-procedure, der er beskrevet her, blev oprindeligt udviklet af D. Sayer i 2001<sup>1</sup> og udviklet til en enkeltrørsanalyse i 2004<sup>2</sup>. Proceduren inddrager en indledende amplifikation af målsekvensen, efterfulgt af enzymatisk behandling til fjernelse af ikke-inkorporerede primere og dNTP'er. Amplikonen anvendes herefter som template til direkte automatisk fluorescerende DNA-sekventering ved anvendelse af speciallavede sekventeringsprimere og Big Dye<sup>®</sup>-terminator-sekventeringskemien, der er tilgængelig fra Applied Biosystems<sup>™</sup> under Life Technologies<sup>™</sup>. Forlængelsesprodukterne oprenses ifølge ethanol-fældningsmetoden og denatureres ved brug af Hi-Di<sup>™</sup>-formamid, der er tilgængelig fra Applied Biosystems<sup>™</sup> under Life Technologies<sup>™</sup>, før separering og påvisning på en automatisk fluorescerende DNA-sekvenator. Det anbefales, at de resulterende data herefter analyseres med ASSIGN<sup>™</sup>-SBT-sekvensanalyse software fra CareDx Pty Ltd.<sup>3-5</sup>

## Tilsigtet anvendelse

CareDx Pty Ltds' OLERUP SBT<sup>™</sup>-HLA-SBT-kits anvendes til typebestemmelse af HLA-klasse I (HLA-A, -B og -C)- og klasse II (HLA-DRB1, -DQB1 og -DPB1)-gener i en laboratorieopsætning fra genomisk DNA. Hvert kit indeholder reagenser, der letter PCR-amplifikationen og DNA-sekventeringen af et bestemt gen. De resulterende sekventeringsdata tolkes herefter ved anvendelse af CareDx Pty Ltd' ASSIGN<sup>™</sup>-SBT-software. Det skal bemærkes, at disse SBT-kits ikke anvendes til diagnosticering af sygdom.

## Kit-sammensætning

Kit	Katalognummer		PRE-PCR-indhold <sup>†</sup> (Antal hætteglas)	POST-PCR-indhold (Antal hætteglas)	
<b>Klasse I</b>					
HLA-A	XH-PD1.1-2(20)	20 tests	<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 25 µL 1 x 352 µL <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 44 µL hver
	XH-PD1.1-2(50)	50 tests	<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 60 µL 1 x 880 µL <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 110 µL hver
HLA-B	BS-PD2.1-2(20)	20 tests	<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 25 µL 1 x 352 µL <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 44 µL hver
	BS-PD2.1-2(50)	50 tests	<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 60 µL 1 x 880 µL <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 110 µL hver

HLA-C	HH-PD 3.2-2(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- HLA-C</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-C MIX</div>	1 x 25 µL 1 x 352 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX7F</div>	1 x 44 µL hver
	HH-PD 3.2-2(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- HLA-C</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-C MIX</div>	1 x 60 µL 1 x 880 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX7F</div>	1 x 110 µL hver
<b>Klasse II</b>						
HLA-DRB1	HH-PD5.2-5(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1 MIX</div>	1 x 10 µL 1 x 370 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">RB-TG344-R</div>	1 x 44 µL hver

	HH-PD5.2-5(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1 MIX</div>	1 x 20 µL 1 x 920 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">RB-TG344-R</div>	1 x 110 µL hver
	LG-PD5.2-7(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1 MIX</div>	1 x 10 µL 1 x 370 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3F-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3R-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">RB-TG344-R</div>	1 x 44 µL hver
	LG-PD5.2-7(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1 MIX</div>	1 x 20 µL 1 x 920 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3F-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3R-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">RB-TG344-R</div>	1 x 110 µL hver
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- DQB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DQB1 MIX</div>	1 x 10 µL 1 x 370 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3R</div>	1 x 44 µL hver
	PQ-PD6.2-2(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- DQB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DQB1 MIX</div>	1 x 20 µL 1 x 920 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3R</div>	1 x 110 µL hver
	AN-PD6.2-3(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- DQB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DQB1 MIX</div>	1 x 10 µL 1 x 370 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3R</div>	1 x 44 µL hver
	AN-PD6.2-3(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DQB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DQB1 MIX</div>	1 x 20 µL 1 x 920 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX2R-3</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3R</div>	1 x 110 µL hver

HLA-DPB1	HH-PD10.1(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 2px;">DNA POL- DPB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DPB1 MIX</div>	1 x 10 µL 1 x 370 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX2R</div>	1 x 44 µL hver
	HH-PD10.1(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 2px;">DNA POL- DPB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DPB1 MIX</div>	1 x 20 µL 1 x 920 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX2R</div>	1 x 110 µL hver
	KD-PD10.2-1(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 2px;">DNA POL – DPB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DPB1 MIX</div>	1 x 10 µL 1 x 370 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">PB-AG341-R</div>	1 x 44 µL hver
	KD-PD10.2-1(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 2px;">DNA POL – DPB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DPB1 MIX</div>	1 x 20 µL 1 x 920 µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 10px;">DPB1EX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">PB-AG341-R</div>	1 x 110 µL hver

†PRE-PCR-kittet indeholder et hætteglas med en locusspecifik PCR-blanding (f.eks. HLA-A MIX), der består af PCR-buffer, dNTP'er, MgCl<sub>2</sub> og locusspecifikke PCR-primere, sammen med et enkelt hætteglas med DNA-polymerase (f.eks. DNA POL- HLA-A).

POST-PCR-kittet indeholder sekventeringsprimere (f.eks. AEX1F).

## Opbevaringskrav

PRE- og POST-PCR-kasserne kan adskilles og opbevares i udpegede PRE- og POST-PCR-frysere. Ved opbevaring ved -20 °C (temperaturintervallet -15 °C til -25 °C er acceptabelt) kan kitbestanddelene anvendes indtil udløbsdatoen, der er angivet på de ydre kitbeholdere, og de kan tåle op til 25 fryse-tø-cykler.

Accelereret stabilitetstestning af HLA-A-, -B-, -C-, -DRB1-, -DQB1- og -DPB1-kittene viste en holdbarhed på 2½ år fra fremstillingsdatoen ved opbevaring ved -20 °C. Mens man venter på bekræftende reeltidstestning, anbefales det kraftigt, at disse kits IKKE bruges efter deres udløbsdato.

For at opretholde optimal ydeevne for kittet skal kitbestanddelene tages ud fra opbevaringsstedet ved -20 °C og tøs hurtigt op ved stuetemperatur før brug. Kitbestanddelene med undtagelse af polymerasen skal herefter vortexblandes med forsigtighed for at sikre, at bestanddelene i hvert rør er ordentligt blandet efter optøning. Efter brug skal kittene/bestanddelene straks returneres til -20 °C.

## Materialer, reagenser og udstyr, der ikke medfølger

### PCR

1. Steriliseret vand
2. Elektroniske eller mekaniske pipetter og aerosolresistente spidser
3. Termisk cyklusapparat med opvarmet låg  
Disse kits er blevet valideret ved brug af følgende termiske cyklusapparater:  
MJ Research PTC 225 DNA Engine DYAD™, Applied Biosystems™ under Life Technologies™, Veriti™ Thermal cyclers, Gene Amp® PCR System 9700 og Eppendorf Mastercycler® Pro.  
**Anvendelse af andre termiske cyklusapparater med disse kits kræver validering af brugeren.**
4. 0,2 mL tyndvægede reaktionsrør til termisk cyklus (8 brønds-strimler eller 96 brønds-plader).  
Anvend de, der anbefales til brug med dit termiske cyklusapparat.
5. Sterile 1,5 mL-rør
6. Sterilt arbejdsområde, såsom biologisk sikkerhedsskab eller stinkskab.
7. Bordcentrifuge med pladeadaptere og en kapacitet til at nå 2500 x g
8. Vortex

### Agarosegelelektroforese

9. Agarosegelelektroforeseapparat
10. 1 % agarose (molekylærbiologisk kvalitet) TBE-gel, der indeholder 0,1 µg/mL ethidiumbromid.
11. Loadingbuffer
12. PCR-markør, der er egnet til at dække intervallet 300 – 1300 bp
13. UV-transilluminator



## Oprensning af PCR-produkt

14. ExoSAP (USB<sup>®</sup> ExoSAP-IT<sup>®</sup>, katalognummer 78200, til 100 reaktioner eller Illustr<sup>™</sup> ExoProStar<sup>™</sup>, katalognr. US77702, til 100 reaktioner)
15. 2 mM MgCl<sub>2</sub> (kan købet hos CareDx Pty Ltd, produktkode MgCl2-1.0(50) eller MgCl2-1.0(3000))
16. Omryster

**Anvendelse af alternative PCR-oprensningsteknikker kræver validering af brugeren før brug.**

## Sekventeringsreaktion

17. BigDye<sup>®</sup>-terminator-cyklusekventeringskit v3.1 eller v1.1, Applied Biosystems<sup>™</sup> under Life Technologies<sup>™</sup>.
18. 5x sekventeringsreaktionsbuffer (CareDx Pty Ltd, produktkode SEQ BUF-2.0(400) eller SEQ BUF-2.0(5000)) eller BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 eller v1.1 5X sekventeringsbuffer, Applied Biosystems<sup>™</sup> under Life Technologies<sup>™</sup>.

## Oprensning af sekventeringsreaktionsprodukter

19. 125 mM EDTA, pH 8,0 (kan købes hos CareDx Pty Ltd, produktkode EDTA-3.0(200) eller EDTA-3.0(5000)).
20. Absolut og 80 % ethanol. Hver kørsel kræver friskfremstillet 80 % ethanol, der består af absolut ethanol og sterilt vand. ANVEND IKKE DENATURERET ETHANOL (også i nogle lande kendt som denatureret sprit).

**Anvendelse af alternative sekventeringsoprensningsteknikker kræver validering af brugeren før brug.**

## Denaturering og elektroforese af sekventeringsreaktionsprodukter

21. Hi-Di<sup>™</sup>-formamid, Applied Biosystems<sup>™</sup> under Life Technologies<sup>™</sup>, produktkode 4311320
22. Automatisk DNA-sekvenator og tilbehør (f.eks. Applied Biosystems<sup>™</sup> under Life Technologies<sup>™</sup> ABI Prism<sup>®</sup> 3730), inklusive dataopsamling og software.  
Disse kits er blevet testet og valideret på Applied Biosystems<sup>™</sup> under Life Technologies<sup>™</sup> 3100, 3730 og 3730xl kapillærsekvenatorer og software.

**Anvendelse af andre denatureringsteknikker og sekventeringsplatforme kræver validering af brugeren før brug.**

23. HLA-sekventeringsanalysesoftware (f.eks. ASSIGN<sup>™</sup> SBT, version 3.6+ eller højere CareDx Pty Ltd).

## Prøvekrav





1. Steriliseret vand (negativ/ingen template-kontrol)
2. Højmolekylært humant genomisk DNA (koncentrationsinterval 20-100 ng/μL i Tris/EDTA-buffer og OD<sub>260/280</sub> > 1,8) ekstraheret fra ACD- eller EDTA-antikoagulerede fuldblodsprøver. Anvend IKKE fuldblodsprøver, der indeholder heparin.

## Advarsler og sikkerhedsmæssige forholdsregler

- Dette kit skal anvendes af uddannet og autoriseret laboratoriepersonale.
- Alle prøver, alt udstyr og alle reagenser skal håndteres i overensstemmelse med god laboratoriepraksis. Især skal alt patientmateriale betragtes som potentielt smittefarligt. Brug af handsker og kitler anbefales kraftigt. Håndtér og bortskaf alt prøvemateriale i henhold til lokale og nationale lovmæssige retningslinjer.
- Der er INGEN farlige stoffer indeholdt i nogen af kitbestanddelene.
- Anvend IKKE reagenser efter deres udløbsdato.
- Anvendelse af kitbestanddele fra forskellige kitpartier anbefales IKKE. En sådan anvendelse kan have indvirkning på analysens ydeevne.
- Anvendelse af reagenser, der ikke er inkluderet i dette kit eller anført under “Materialer, reagenser og udstyr, der ikke medfølger” (f.eks. alternative *Taq*-DNA-polymeraser), anbefales IKKE. En sådan anvendelse kan have indvirkning på analysens ydeevne.
- Vær omhyggelig med at undgå krydskontaminering af DNA-prøver. Skift spidser mellem DNA-prøver, hvor det er muligt.
- Pre- og Post-PCR-aktiviteter skal være strengt fysisk adskilt. Anvend specifikt udpeget/udpegede udstyr, reagenser og kitler.
- Ethidiumbromid er et potentielt karcinogen. Der skal altid bruges beskyttelseshandsker ved fremstilling og håndtering af geler. Bortskaf ethidiumbromidgeler og buffere i henhold til lokale og nationale retningslinjer.
- Undgå altid direkte eksponering og brug passende UV-blokerende ansigtsbeskyttelse, engangshandsker og kitler under inspektion og fotografering af agarosegeler under UV-lys,

## Symboler

Følgende ikke-standardsymboler er blevet anvendt:

Symbol	Beskrivelse
	Locusspecifik PCR-blanding
	DNA-polymerase
	HLA-A-exon 1-fremad sekventeringsprimer. Der henvises til “Kitsammensætning” og tabel 4 for andre sekventeringsprimere.
	Fremstillingsdato (kræves til ikke-EU-markeder).

# Procedure

## 1. PCR

- 1.1. Det er nødvendigt at opsætte en separat PCR-reaktion for hvert locus, der skal amplificeres, og for hver individuelle prøve, der skal testes. Hver kørsel skal inkludere en eller flere passende positive kontroller med kendt genotype og mindst én negativ kontrol for hvert locus, der amplificeres.
- 1.2. Fremstil en frisk opløsning af PCR-masterblanding hver gang, der udføres en PCR. Optø hurtigt den locusspecifikke PCR-blanding ved stuetemperatur. Når den er optøet, blandes den kortvarigt på vortexblander.
- 1.3. Fordel den nødvendige mængde af PCR-blanding og DNA-polymerase i et sterilt rør til det antal prøver, der skal testes (der henvises til tabel 1 nedenfor for volumen pr. reaktion). Puls-vortexbland opløsningen 3-4 gange.

Locus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Locusspecifik PCR-blanding f.eks. <b>HLA-A MIX</b>	16 µL	16 µL	16 µL	16,7 µL	16,7 µL	16,7 µL
DNA-polymerase f.eks. <b>DNA POL- HLA-A</b>	1 µL	1 µL	1 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL

**Tabel 1: Sammensætning af masterblandingen, der er nødvendig pr. prøve.**

- 1.4. Fordel 17 µL af masterblandingen i hver reaktionsbrønd.
- 1.5. Tilsæt 3 µL prøve-DNA eller passende positive kontroller til hver reaktionsbrønd. Tilsæt 3 µL sterilt vand til reaktionsbrønden med den negative kontrol.
- 1.6. Forsegl reaktionsbrøndene. Bland forsigtigt med vortexblander, og centrifuger kortvarigt.
- 1.7. Anbring reaktionsbrøndene i et termisk cyklusapparat og lav en kørsel ifølge betingelserne for den termiske cyklus nedenfor.

95 °C - 10 minutter  
96 °C - 20 sekunder } 33 cykler  
60 °C - 30 sekunder }  
72 °C - 3 minutter }  
15 °C - hold

- 1.8. Amplifikation tager ca. 2,5 timer at gennemføre.
- 1.9. Når PCR'en er gennemført, fjernes reaktionsbrøndene/pladen fra det termiske cyklusapparat, hvorefter de/den enten fortsætter direkte til gelelektroforese eller opbevares ved 4 °C indtil anvendelse.

**BEMÆRK:** Oprensning af amplikoner ved hjælp af ExoSAP-behandling skal finde sted inden for 24 timer efter udførelse af PCR.

## 2. Agarosegelelektroforese

- 2.1. Bekræft succesfuld amplifikation ved hjælp af agarosegelelektroforese ved brug af 2  $\mu\text{L}$  af hvert PCR-produkt kombineret med 5  $\mu\text{L}$  loadingbuffer (alternative voluminer af loadingbuffer skal valideres før brug). Anvendelse af 1 %-agarosegeler anbefales.
- 2.2. Antallet og de forventede størrelser af de resulterende amplikoner vil variere alt efter locus og prøvegenotype. Forventede PCR-amplikonstørrelser er angivet i tabel 2.

Locus	Forventede båndstørrelser
HLA-A	$\approx 2$ kbp
HLA-B	$\approx 2$ kbp
HLA-C	$\approx 1,1$ kbp og $1,4$ kbp
HLA-DRB1	$\approx 450$ bp - $850$ bp (HH-PD5.2-5) $\approx 630$ bp - $980$ bp (LG-PD5.2-7) Båndmønsteret vil variere afhængig af tilstedeværelsen af specifikke allelgrupper
HLA-DQB1	$\approx 300$ bp og $500$ bp (PQ-PD6.2-2) $\approx 400$ bp og $500$ bp (AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	$\approx 400$ bp (HH-PD10.1) $\approx 400$ bp, $\approx 780$ bp og $\approx 1470$ bp (KD-PD10.2-1)

**Tabel 2: Forventede produktstørrelser for hver analyse.**

## 3. Oprensning af PCR-produkt

**BEMÆRK:** Andre oprensningssystemer end EXOSAP-IT<sup>®</sup> eller ExoProStar<sup>™</sup> (f.eks. Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP eller søjlebaserede systemer) kan anvendes til oprensning af disse PCR-produkter. Det anbefales kraftigt, at brugerne validerer disse procedurer før anvendelse. Hvis EXOSAP-behandling skal anvendes, anbefales det, at brugerne følger proceduren, der er beskrevet nedenfor.

- 3.1. Fremstil en masterblanding, der består af 4  $\mu\text{L}$  ExoSAP-IT<sup>®</sup> eller ExoProStar<sup>™</sup> og 8  $\mu\text{L}$  2 mM  $\text{MgCl}_2$  pr. prøve, der skal oprenses. Bland ved hjælp af forsigtig puls-vortexblanding. Tilsæt 12  $\mu\text{L}$  af masterblandingen i reaktionsbrønden for hver reaktiv prøve. Forsegl brøndene, vortexbland og anbring dem på en omryster eller vortexbland forsigtigt i 2 minutter. Centrifuger kortvarigt før anbringelse i det termiske cyklusapparat. Kør den termiske cyklus efter følgende profil:

37 °C – 30 minutter  
80 °C – 15 minutter  
4 °C - hold

- 3.2. Efter gennemførelse fortyndes det oprensede produkt 1:4 med sterilt vand. Dette fortyndingstrin vil sikre, at der er tilstrækkelig template til udførelse af

sekventeringsreaktionerne, og sikre, at koncentrationen af templaten er tilstrækkelig til at frembringe sekvensdata af god kvalitet.

**BEMÆRK:** En højere fortyndingsfaktor (f.eks. 1:8) kan være nødvendig, hvis der observeres konsekvent høje signaler og tilknyttet støj og artefakter. Svagere PCR-produkter kan kræve en lavere fortyndingsfaktor.

3.3. ExoSAP-behandlede prøver kan opbevares ved 4 °C, indtil de er klar til brug. Disse prøver kan opbevares ved 4 °C i op til en uge før brug, men skal opbevares ved -20 °C ved langtidsopbevaring.

## 4. Sekventeringsreaktion

**BEMÆRK:** I tilfælde, hvor heterozygotiske tvetydigheder skal løses med hemizygotiske sekventeringsprimere, såsom HARPS<sup>®</sup>, henvises til brugsanvisningen til OLERUP SBT<sup>™</sup> HARPS<sup>®</sup>.

4.1. Tabel 3 viser en liste over sekventeringsprimere, der anvendes til hvert enkelt locus.

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

**Tabel 3: Sekventeringsprimere, der leveres til brug til hvert enkelt locus.**

<sup>†</sup>RB-TG344-R er en HARPS<sup>®</sup>, der er rettet mod kodon 86-dimorfi. Brug af denne er valgfri.

<sup>\*</sup>PB-AG341-R er en HARPS<sup>®</sup>, der er rettet mod kodon 85-dimorfi i DPB1. Brug af denne er valgfri.

^DRB1EX3R-2 er en DRB1-sekventeringsprimer i HH-PD5.2-5-kittene, der opfører sig tilsvarende en HARP og er beregnet til sekventering af følgende allelgrupper: \*03, \*08, \*11, \*12, \*13, \*14, \*15 og \*16. Denne primer vil frembringe enten heterozytiske, hemizygotiske eller ingen sekventeringsdata afhængig af genotypen af prøven, der typebestemmes. Når DRB1EX3R-2-data analyseres i ASSIGN™ mod DRB1-FullX2-referencen vil de resulterende exon 3-data blive analyseret i et separat lag, og de vil åbne mulighed for løsning af en række alleltvetydigheder i exon 3, såsom DRB1\*14:01 vs. \*14:54-uklarheden. Brug af denne er valgfri afhængig af den typebestemmelsesstrategi, der anvendes af laboratoriet. Dette gælder ikke for LG-PD5.2-7-kittene, da bidirektionel sekventering af exon 3 er tilgængelig.

4.2. Fremstil en frisk opløsning af sekventeringsprimerblanding på is hver gang, der udføres en sekvensreaktion. Sammensætningen og voluminerne for blandingen er angivet **pr. prøve.**

<b>Bestanddel</b>	<b>Volumen</b>
Sekventeringsprimer	2µL
Sterilt vand	11,5µL
BigDye®-terminatorer	1µL
5X sekventeringsbuffer	3,5µL

4.3. Bland hver sekventeringsreaktionsblanding forsigtigt ved hjælp af puls-vortexblanding.

4.4. Fordel 18 µL af sekventeringsreaktionsblandingen i hvert/hver relevant reaktionsrør/brønd.

**BEMÆRK:** Ved kørsler, der inddrager få prøver med mange sekventeringsprimere, er det acceptabelt at tilsætte sekventeringsprimeren (2 µL) direkte i de individuelle reaktionsbrønde. Der kan herefter fremstilles en masterblanding, der består af sterilt vand, BigDye®-terminatorer og 5x Seq Rxn Buffer, hvoraf der skal tilsættes 16 µL til hver reaktionsbrønd. Det anbefales kraftigt, at brug af denne alternative procedure valideres af brugeren før implementering.

4.5. Tilsæt 2 µL oprenset PCR-produkt til hver relevant brønd.

**BEMÆRK:** Vær omhyggelig med at undgå krydskontaminering af sekvensreaktioner.

4.6. Forsegl reaktionsbrøndene, bland forsigtigt og centrifugér kortvarigt for at sikre, at indholdet befinder sig i bunden af hver reaktionsbrønd.

4.7. Anbring reaktionsrørene i et termisk cyklusapparat og kørs efter følgende profil:

<b>Antal cykler</b>	<b>Temperatur og tid</b>
25	96 °C – 10 sekunder 50 °C – 5 sekunder 60 °C – 2 minutter
1	4 °C - hold

4.8. Når programmet er gennemført, fjernes reaktionsbrøndene/pladen fra det termiske cyklusapparat, hvorefter de/den enten fortsætter direkte til oprensning af reaktionsprodukterne eller opbevares i mørke ved 4 °C indtil anvendelse. Det anbefales, at prøver oprenses og køres på DNA-sekvenatoren inden for 24 timer.

## 5. Oprensning af sekventeringsreaktionsprodukter

**BEMÆRK:** Oprensning af reaktionsprodukterne kan udføres ved hjælp af andre procedurer end ethanol-fældningsmetoden, der er beskrevet her. Det anbefales kraftigt, at brugerne validerer disse procedurer før anvendelse.

- 5.1. Centrifuger kortvarigt reaktionsrørene/pladerne, før der fortsættes. Hvis der er anvendt låg/hætter, der kan genbruges, under den termiske cyklus, skal lågene/hætterne mærkes for at undgå krydskontaminering.
- 5.2. Fjern forsigtigt forseglingen.
- 5.3. Til hvert reaktionsrør tilsættes 5 µL 125 mM EDTA, pH 8,0. Sørg for, at EDTA'en når bunden af reaktionsrøret.
- 5.4. Tilsæt 60 µL 100 % ethanol til hver reaktionsbrønd. Forsegl brøndene/pladen, og vortexbland kortvarigt men grundigt for at sikre grundig opblanding.
- 5.5. Pelletér forlængelsesprodukterne ved hjælp af centrifugering ved 2000g i 45 minutter. **GÅ STRAKS VIDERE TIL NÆSTE TRIN.** Hvis dette ikke er muligt, recentrifugeres i yderligere 10 minutter, før der fortsættes.
- 5.6. Tag forseglingerne af reaktionsbrøndene, og fjern supernatanten ved at vende reaktionsbrøndene med bunden i vejret på en papirserviet.
- 5.7. Anbring de omvendte reaktionsbrønde og papirservietten i centrifugen. Centrifuger ved 350g i 1 minut til fjernelse af resterende supernatant.
- 5.8. Tag reaktionsbrøndene ud af centrifugen, og anbring dem i opretstående position på arbejdsbordet. Smid papirservietten væk.
- 5.9. Fremstil en frisk opløsning af 80 % ethanol med absolut ethanol og sterilt vand.
- 5.10. Tilsæt 60 µL 80 % ethanol til hver brønd. Forsegl på ny brøndene, og vortexbland kortvarigt.
- 5.11. Centrifuger ved 2000g i 5 minutter.
- 5.12. Gentag trinene 5.6 og 5.7.
- 5.13. Fjern reaktionsrørene fra centrifugen, og smid papirservietten ud. Forsegl på ny reaktionsbrøndene, og gå videre til denatureringstrinet. Eller opbevar ved -20 °C i mørke. Det anbefales, at forlængelsesprodukterne køres på DNA-sekventatoren inden for 24 timer efter opsætning af sekventeringsreaktionerne.

## 6. Denaturering & elektroforese af sekventeringsreaktionsprodukter

**BEMÆRK:** Proceduren for denaturering af forlængelsesprodukter i Hi-Di™-formamid, der er beskrevet her, er muligvis ikke nødvendig, hvis der er brugt andre oprensningsprocedurer end ethanol-fældning. Det anbefales kraftigt, at brugerne validerer alternative procedurer før anvendelse.

- 6.1. Tilsæt 12 µL Hi-Di™-formamid til hvert reaktionsrør. Vortexbland og centrifuger brøndene/pladen kortvarigt.
- 6.2. Inkubér reaktionsbrøndene ved 98 °C i 5 minutter. Sørg efter inkubation for, at reaktionsbrøndene hurtigt nedkøles til stuetemperatur (anbring f.eks. disse på is eller

brug det termiske cyklusapparat til at udføre denaturerings- og nedkølingstrinene), før de anbringes på sekvenatoren. Hvis det ikke er muligt at køre pladerne straks, opbevares disse ved 4 °C indtil anvendelse.

**BEMÆRK:** Sørg for, at der ikke er luftbobler i reaktionsbrøndene. Disse kan trænge ind og beskadige kapillæret.

6.3. Sæt reaktionsbrøndene/pladen på den automatiske sekvenator, og klargør dataopsamlingsfilen i henhold til sekvenatorproducentens specifikationer.

6.4. Følgende instrumentparametre er blevet valideret af producenten ved brug af Big Dye<sup>®</sup>-terminator-sekventeringskit v3.1 og POP-7<sup>™</sup>. Disse parametre kan kræve brugervalidering for andre polymerer, sekventeringskemier og instrumenter. Der henvises til den relevante instrumentbrugervejledning for detaljerede anvisninger og vejledning (sørg f.eks. for, at dye-sæt-indstillingen er korrekt i forhold til den anvendte kemi. For eksempel kræver v1.1 Big Dye<sup>®</sup>-terminator-sekventeringskemi et andet dye-sæt).

<b>Parameter</b>	<b>Indstilling</b>
Dyeset (Dye-sæt)	Z_BigDyeV3
Mobility file (Mobilitetsfil)	KB_3730_POP7_BDTV3
Basecaller	KB.bcp
Run Module (Kørselsmodul)	Regular FastSeq50_POP7
Injection time (Injektionstid)	15 sek.
Run time (Kørselstid)	3000 sek.

6.5. Brug instrumentets dataopsamlingssoftware til behandling af de rå indsamlede data og frembringelse af sekvensfilerne. Der henvises til den relevante instrumentbrugervejledning for detaljerede anvisninger og vejledning.

## 7. Redigering og analyse af elektroferogrammer

OLERUP SBT<sup>™</sup>-kittene er udviklet og valideret ved brug af OLERUP ASSIGN<sup>™</sup>-SBT- der er udviklet af CareDx Pty Ltd. Brugere anbefales at bruge ASSIGN SBT-versioner 3.6+ og derover, da disse versioner af softwaren anvender indstillings- og referencefiler, der er specifikt udformet til OLERUP SBT<sup>™</sup>-typebestemmelseskittene og HARPS<sup>®</sup>. For yderligere oplysninger om anvendelsen af denne software henvises til de relevante brugervejledninger, der kan downloades fra Olerup website (<http://www.olerup.com>).

Sekventeringen, der er baseret på typebestemmelsesdata frembragt ved anvendelse af OLERUP SBT<sup>™</sup>-typebestemmelseskittene bør analyseres mod følgende ASSIGN<sup>™</sup>-referencefiler, der leveres af CareDx Pty Ltd:

<b>Analyse</b>	<b>Produktkode</b>	<b>ASSIGN-referencefil</b>
OLERUP SBT <sup>™</sup> HLA-A	XH-PD1.1-2	A.xml
OLERUP SBT <sup>™</sup> HLA-B	BS-PD2.1-2	B.xml
OLERUP SBT <sup>™</sup> HLA-C	HH-PD3.2-2	C.xml eller Cw.xml
OLERUP SBT <sup>™</sup> HLA-DRB1	HH-PD5.2-5	DRB1-FullX2.xml
	LG-PD5.2-7	527_DRB1.xml



Analyse	Produktkode	ASSIGN-referencefil
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

## Ydeevnekarakteristika

### Nøjagtighed

Paneler af op 93 prøver fra UCLA International DNA Exchange proficiency testing program (2008-2010), der blev anvendt til intern testning til OLERUP SBT™-kittene, gav følgende resultater:

Locus	Antal testede prøver	Diagnostisk Følsomhed (% succesfulde PCRer)	Diagnostisk specificitet (% opnåede genotyper)	Antal diskordante prøver	Antal heterozygotiske prøver	Antal unikke alleler
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
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

\* De to diskordante prøver indeholdt yderligere sekvensinformation uden for exon 2, som ikke var rapporteret af UCLA International DNA Exchange proficiency testing program. Én prøve indeholdt 131:01, men var rapporteret som 13:01 af UCLA International DNA Exchange proficiency testing program. Allelerne er forskellige i exon 3 og 4. Den anden prøve indeholdt 107:01, men var rapporteret som 13:01 af UCLA International DNA Exchange proficiency testing program. Disse alleler er forskellige i exon 1.

For OLERUP SBT™ HLA-DRB1-kittene (produktkode LG-PD5.2-7) blev anvendt et panel af 23 velkarakteriserede prøver, der dækkede et bredt spekter af alleler, til intern test. Endvidere blev også et panel af 293 eksternt opnåede prøver typebestemt uden *a priori*-kendskab til andre HLA-typebestemmelsesdata. Disse prøver blev også testet med OLERUP SBT™-HLA-DQB1-analysen (PQ-PD6.2-2). I de tilfælde, hvor der blev opnået et homozygotisk resultat, blev DQB1/DRB1-forbindelserne for disse prøver undersøgt til bekræftelse af resultatet samt påvisning af tilfælde, hvor der kan være forekommet allel-dropout.

Testen gav følgende resultater:

<b>Locus</b>	<b>Antal testede prøver</b>	<b>Diagnostisk følsomhed</b>	<b>Diagnostisk specificitet</b>	<b>Antal diskordante prøver</b>	<b>Antal heterozygotiske prøver</b>	<b>Antal unikke alleler</b>
HLA-DRB1	23	100%	100%	0	23	12
	286*	97.9%	99.6%	0	253	33

\* For seks prøver mislykkedes amplifikation på grund af en dårlig DNA-prøvekvalitet. Én prøve viste sig at indeholde kontaminerende DNA, hvor kilden stammede fra laboratoriet, hvorfra prøverne var opnået. På grund af kontamineringen kunne der ikke opnås en genotype for denne prøve.

Sekvensanalyse af PCR og sekventeringsprimersteder og ydeevneevalueringsundersøgelser har ikke identificeret nogen almindelige og veldokumenterede alleler, der ikke er blevet amplificeret ved den anbefalede brug af disse kits. For yderligere oplysninger henvises til OLERUP SBT™-primeranalyzedokumentet, der er tilgængeligt sammen med hver OLERUP ASSIGN™-SBT-referencefrigivelse, der kan downloades fra Olerup' website (<http://www.olrup.com>).

## Detektionsgrænse

Den anbefalede koncentration af højmolekylært humant genomisk DNA er 20-100 ng/μL. Intern testning har vist, at prøver med koncentrationer så lave som 5 ng/μL også kan anvendes. Korrekte genotyper opnåedes også fra DNA af dårlig kvalitet eller sheared DNA.

## Specificitet

CareDx Pty Ltd's SBT™-kits er locusspecifikke analyser. Anvendelse af kittene i overensstemmelse med disse anvisninger skulle kun amplificere et enkelt locus. I de fleste tilfælde vil anvendelsen af sekventeringsprimerne, der er inkorporeret i hvert kit, frembringe en HLA-typebestemmelse for de fleste prøver, uden at der er behov for yderligere opløsning. I de tilfælde, hvor der er heterozygotiske tvetydigheder, anbefales anvendelse af opløsende sekventeringsprimere (såsom OLERUP SBT™ HARPS®).

Det skal bemærkes, at mutationer i amplifikations- eller sekventeringsprimersteder er mulige og kan resultere i allel-dropout. Prøver, der tyder på et homozygotisk typebestemmelsesresultat, skal bekræftes ved hjælp af alternative procedurer.

## Begrænsninger og forholdsregler

- Det anbefales kraftigt, at disse kits valideres af brugeren før implementering i laboratoriet ved brug af prøver, hvis HLA-type er blevet bestemt ved hjælp af andre molekylærbaserede procedurer. Især skal enhver afvigelse fra denne procedure (f.eks. brug af alternative PCR- eller DNA-sekventeringsoprensningsprocedurer) valideres af brugeren før implementering.
- Disse kits er blevet valideret ved brug af paneler af prøver, hvis genotyper dækker et bredt spekter af alleler. Det skal dog bemærkes, at man kan støde på sjældne alleler og alleler med polymorfi i amplifikations- og sekventeringsprimerstederne, og disse amplificeres eller sekventeres muligvis ikke.

- Karakteren af HLA-sekvensbaseret typebestemmelse er således, at andre faktorer end PCR-blandingen kan resultere i præference-amplifikation eller allel-dropout. Som følge heraf skal tilsyneladende homozygotiske typebestemmelsesresultater bekræftes ved brug af alternative metoder og/eller familiær genotypebestemmelse.
- En positiv kontrol (human DNA) og negativ kontrol (sterilt vand) skal inkluderes ved hver PCR-kørsel. Den positive kontrol skal frembringe et PCR-produkt med den passende størrelse afhængig af det amplificerede locus, og den resulterende sekvens skal være i overensstemmelse med prøvens genotype. Der må ikke være nogen PCR-produkter i den negative templatekontrol for hvert forsøg. Hvis der fremkommer et bånd, kan der være sket kontaminering på et eller andet niveau, og kørslen skal gentages.
- Der kan lejlighedsvis ses større, svagere PCR-produkter. Disse ekstra bånd interfererer ikke med sekvensresultaterne eller kvaliteten.

## Licens

OLERUP SBT™-kittene indeholder GoTaq®-Hot Start-polymerase (DNA POL), der fremstilles af Promega Corporation til distribution af CareDx Pty Ltd. Med licens til Promega under US patent nr. 5.338.671 og 5.587.287 og de tilsvarende udenlandske patenter.

## Litteraturliste

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. Mere information om the UCLA DNA Exchange Program kan findes på: <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm>.
7. Aktuelle HLA-alleler kan findes på: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.

## Fejlfinding

Problem	Mulig(e) årsag(er)	Løsning
Intet eller svagt PCR-produkt	DNA af dårlig kvalitet	Vurdér DNA-kvaliteten ved hjælp af gelelektroforese. Intakt DNA skal være ca. 3 kb med lidt eller ingen tegn på smearing på gelen. Reekstrahér DNA og gentag PCR, hvor det er muligt.
	Utilstrækkelig mængde af DNA tilsat til PCR.	Kontrollér, at koncentrationen af DNA er mellem 20-100 ng/μL. Reekstrahér DNA og gentag PCR, hvor det er muligt.
	Tilstedeværelse af PCR-inhibitorer i genomisk DNA	Undgå brug af fuldblodsprøver, der indeholder heparin. Reekstrahér DNA og gentag PCR, hvor det er muligt.
	DNA-polymerase ikke tilsat til masterblandingen eller utilstrækkelig opblanding af masterblandingen før tilsætning til prøver.	Gentag PCR. Sørg for, at masterblandingsbestanddele tilsættes og blandes tilstrækkeligt ved hjælp af vortexblander.
	Problemer med termisk cyklus	Kontrollér parametrene for kørslen af den termiske cyklus. Kontrollér kørselshistorien for at sikre, at kørslen ikke blev afsluttet før tid. Sørg for, at det termiske cyklusapparat fungerer ifølge producentens specifikationer og vedligeholdes regelmæssigt.
	Intet ethidiumbromid tilsat til gelen.	Nedsæk gelen i et farvebad, der indeholder 1X TBE med 0,5 mg/mL ethidiumbromid. Affarv i 1X TBE, før der tages gelbillede. Sørg for, at ethidiumbromid tilsættes til gelen, før den støbes.
	DNA-prøver er elueret eller fortyndet i vand, der kan have et let surt pH.	Brug sterilt vand med neutralt pH, hvor det er muligt.
Intet eller svagt PCR-produkt for exon 3-5-båndet for KD-PD10.2-1-analysen	Dårlig DNA-kvalitet	Amplifikation af prøver af meget dårlig kvalitet kan resultere i svag amplifikation af exon 3-5-amplikonen. Typebestemmelse kan stadig opnås ved anvendelse af exon 1 og 2-sekvensdata. Alternativt

<b>Problem</b>	<b>Mulig(e) årsag(er)</b>	<b>Løsning</b>
		skal DNA om muligt reekstraheres, og PCR gentages.
Ukorrekte båndstørrelser	Anvendelse af ukorrekt kit	Kontrollér, at det passende kit anvendes.
	Anvendelse af ukorrekt termisk cyklus-program.	Kontrollér parametrene for den termiske cyklus.
	PCR-kontaminering	Kontrollér den negative kontrol for tegn på kontaminering. Dekontaminér arbejdsområdet og gentag PCR. Gentag PCR for at identificere kontamineringskilden. Overvej at bruge et nyt kit. Hvis det genomiske DNA i en prøve ser ud til at være kontamineret, gentag da ekstraktionen eller opnå en alternativ kilde af DNA.
Svag signalintensitet på elektroferogrammer	Svagt PCR-produkt	Kontrollér gelbilledet. Sekventering af svage PCR-bånd anbefales IKKE, da sekvenskvaliteten kan være utilstrækkelig til SBT. Overvej at bruge en lavere fortyndingsfaktor (f.eks. 1:2, 1:3) efter PCR-oprensning.
	Utilstrækkelig mængde af reaktionsprodukt påsat sekvenatoren	Kontrollér sekvenatorparametre. Det kan være nødvendigt at øge injektionstid og spænding.
	Problemer under oprensning af sekvenatorprodukter	Vær yderst omhyggelig, når supernatanten fjernes, da dette kan flytte pelleten.
Signalintensiteten er for høj (tilstedeværelse af høje fluorescerende toppe – artefakter)	For meget PCR-produkt	Kontrollér gelbilledet. Overvej at bruge en højere fortyndingsfaktor efter PCR-oprensning. Kontrollér mængden af DNA-polymerase, der anvendes i PCR'en.
	For stor mængde af reaktionsprodukter påsat sekvenatoren.	Kontrollér instrumentparametre. Overvej at reducere injektionstiden og spændingen.
Baseline-støj (høj baggrund)	Kontamineret PCR-produkt	Der henvises til korrigerende handlinger, der er anført ovenfor.
	Amplifikation af nært beslægtede HLA-gener	Kontrollér parametre for termisk cyklus.

<b>Problem</b>	<b>Mulig(e) årsag(er)</b>	<b>Løsning</b>
	Dårlig PCR-oprensning	Sørg for, at ExoSAP-behandling udføres ifølge kittets brugsanvisning. Sørg for, at PCR-blandingen blandes grundigt med ExoSAP. Overvej at bruge ExoSAP ifølge producentens procedure (ved forøgelse af mængden af enzym), eller overvej en alternativ oprensningsteknik.
	Kontaminerede sekventeringsreaktioner	Sørg for, at alle forholdsregler tages for at forhindre krydskontaminering. Skift pipettespidser, hvor det er muligt. Tilsæt væsker i toppen af reaktionsbrøndene. Undgå aerosoler.
	Kontamineret sekventeringsprimer	Kontrollér sekvenskvaliteten for de andre sekventeringsprimere og andre prøver ved brug af den samme primer. Overvej at bruge en frisk portion sekventeringsprimer.
	Kontamineret farveterminator-blanding eller sekventeringsbuffer	Gentag sekventering med en frisk portion reagenser.
	Dårlig oprensning af sekventeringsprodukter.	Gentag sekventering og sørg for, at oprensningen udføres ifølge producentens anvisninger.
Tilstedeværelse af farveklatter	Dårlig oprensning af sekventeringsprodukter	Oprrens produkterne ifølge kitanvisningerne. Sørg for, at produkterne vaskes tilstrækkeligt med 80 % ethanol.

## Relaterede produkter

CE-mærkede IVD'er:

ASSIGN™ SBT V3.6+

Produktkode: CGX0036+

ASSIGN™ SBT V4.7

Produktkode: CGX00470

OLERUP ASSIGN™ SBT V471

Produktkode: CGX00471

## **OLERUP SBT™ HARPS®**

For fuld produktliste, henvises til OLERUP SBT™ HARPS® Brugsanvisning

Udelukkende til forskningsbrug:

### **OLERUP SBT™**

AN-PD11.0-0(20) OLERUP SBT™ HLA-DRB3 kit (20 og 50 tests)  
AN-PD11.0-0(50)

AN-PD12.0-0(20) OLERUP SBT™ HLA-DRB4 kit (20 og 50 tests)  
AN-PD12.0-0(50)

AN-PD13.0-0(20) OLERUP SBT™ HLA-DRB5 kit (20 og 50 tests)  
AN-PD13.0-0(50)

LC-PD2.9(20) OLERUP SBT™ HLA-B57 kit (20 og 50 tests)  
LC-PD2.9(50)

Bemærk: produkterne, der er anført ovenfor, er godkendt som IVD'er i Australien

### **Laboratoriereagenser til generelle formål**

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)

Kontakt venligst din lokale distributør for yderligere oplysninger.



### **Selvcertificerede kits:**

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

### **Support og kontaktoplysninger**

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

For bestillingsoplysninger henvises til Olerup-hjemmesiden (<http://www.olerup.com>).