

HLA-Typisierungskits

Gebrauchsanweisung

PCR-Amplifikation und Sequenzierung von Loci der HLA-Klasse I und II

Version Nr.: 1.4

Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 2020

IVD



CareDx Pty
20 Collie St.
Fremantle 6160
Western Australia
Australien



Qarad bvba
Cipalstraat 3
B-2440 Geel
Belgien

Inhalt

PRINZIP	3
VORGESEHENE VERWENDUNG	3
ZUSAMMENSETZUNG DES KITS	4
ANFORDERUNGEN AN DIE LAGERUNG	9
NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN, REAGENZIEN UND GERÄTE	10
ANFORDERUNGEN AN DIE PROBE	11
WARNUNGEN UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN	12
SYMBOLE	12
VERFAHREN	13
1. PCR	13
2. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	14
3. REINIGUNG DES PCR-PRODUKTS	14
4. SEQUENZIERUNGSREAKTION	15
5. REINIGUNG VON SEQUENZIERUNGSREAKTIONSPRODUKTEN	17
6. DENATURIERUNG UND ELEKTROPHORESE VON SEQUENZIERUNGSREAKTIONSPRODUKTEN	18
7. BEARBEITUNG UND ANALYSE VON ELEKTROPHEROGRAMMEN	19
LEISTUNGSMERKMALE	20
GENAUIGKEIT	20
NACHWEISGRENZE	21
SPEZIFITÄT	21
STÖRSUBSTANZEN	21
BESCHRÄNKUNGEN UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN	23
LIZENZ	23
BIBLIOGRAPHIE	24
FEHLERBEHEBUNG	25
VERWANDTE PRODUKTE	28
OLERUP SBT™ HARPS®	28
KONTAKTINFORMATIONEN	29

Prinzip

Das hier beschriebene Verfahren des HLA Sequencing Based Typing (SBT) (HLA-sequenzbasierte Typisierung) wurde ursprünglich von D. Sayer 2001¹ entwickelt und 2004² zu einem Einzelröhrchen-Assay entwickelt. Das Verfahren beinhaltet die anfängliche Amplifikation der Zielsequenz, gefolgt von einer enzymatischen Behandlung, um nicht aufgenommene Primer und dNTPs zu entfernen. Das Amplikon wird danach als Vorlage für die direkte automatisierte Fluoreszenz-DNA-Sequenzierung mit maßgeschneiderten Sequenzierungsprimern und der Big Dye[®]-Terminator-Sequenzierungsschemie verwendet, die bei Applied Biosystems[™] by Life Technologies[™] erhältlich ist. Die Erweiterungsprodukte werden nach der Ethanolfällungsmethode gereinigt und mit Hi-Di[™]-Formamid von Applied Biosystems[™] by Life Technologies[™] denaturiert, bevor sie in einem automatisierten fluoreszierenden DNA-Sequencer getrennt und detektiert werden. Es wird empfohlen, die resultierenden Daten anschließend mit der Sequenzanalyse-Software ASSIGN[™] SBT von CareDx Pty Ltd³⁻⁵ zu analysieren.

Vorgesehene Verwendung

Die Kits OLERUP SBT[™] HLA SBT von CareDx Pty Ltd werden für die Typisierung von Genen der HLA-Klasse I (HLA-A, -B und -C) und der Klasse II (HLA-DRB1, -DQB1 und -DPB1) aus genomischer DNA in einem Labor verwendet. Jedes Kit enthält Reagenzien, die die PCR-Amplifikation und DNA-Sequenzierung eines bestimmten Gens erleichtern. Die daraus resultierenden Sequenzierungsdaten werden danach mithilfe der Software ASSIGN[™] SBT von CareDx Pty Ltd interpretiert. Es ist zu beachten, dass diese SBT-Kits nicht zur Diagnose von Krankheiten verwendet werden, sondern als Teil des Prozesses zur Bestimmung der Kompatibilität zwischen Spendern und Empfängern verwendet werden können. Der Test ist ein DNA-Sequenzierungstest, der eine DNA-Sequenz eines Teils eines HLA-Gens erzeugt. Die vorgesehenen Benutzer des Geräts sind entsprechend qualifiziertes Personal, das die Frequenz der HLA-Typen in deren Population kennt. Die Tests sind in regulierten Laboratorien durchzuführen.

Zusammensetzung des Kits

Kit	Katalognr.		PRE-PCR-Inhalt [†] (Anz. Ampullen)	POST-PCR-Inhalt (Anz. Ampullen)		
Klasse I						
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-</div>	1 x 25  1 x 352 	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX1R</div> </div> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX2R</div> </div> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX3R</div> </div> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX4R</div> </div> </div>	Jeweils 1 x 44 
	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-</div>	1 x 60  1 x 880 	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX1R</div> </div> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX2R</div> </div> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX3R</div> </div> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX4R</div> </div> </div>	Jeweils 1 x 110 
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-</div>	1 x 25  1 x 352 	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX2F</div> </div> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX3F</div> </div> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX4F</div> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX4R</div> </div>	Jeweils 1 x 44 
	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-</div>	1 x 60  1 x 880 	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX2F</div> </div> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX3F</div> </div> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX4F</div> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX4R</div> </div>	Jeweils 1 x 110 

Kit	Katalognr.		PRE-PCR-Inhalt [†] (Anz. Ampullen)		POST-PCR-Inhalt (Anz. Ampullen)		
HLA-C	HH-PD 3.2-2(20)	20 Tests	<div data-bbox="862 475 1115 517" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">DNA POL – HLA-C</div> <div data-bbox="862 528 1032 569" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">HLA-C-</div>	1 x 25  1 x 352 	<div data-bbox="1330 475 1480 517" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX1F</div> <div data-bbox="1330 528 1480 569" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX2F</div> <div data-bbox="1330 580 1480 622" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX3F</div> <div data-bbox="1330 633 1480 675" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX4F</div> <div data-bbox="1330 686 1480 727" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX5F</div> <div data-bbox="1330 738 1480 780" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX6F</div> <div data-bbox="1330 791 1480 833" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX7F</div>	<div data-bbox="1503 475 1653 517" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX1R</div> <div data-bbox="1503 528 1653 569" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX2R</div> <div data-bbox="1503 580 1653 622" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX3R</div> <div data-bbox="1503 633 1653 675" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX4R</div> <div data-bbox="1503 686 1653 727" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX5R</div> <div data-bbox="1503 738 1653 780" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX6R</div>	Jeweils 1 x 44 
	HH-PD 3.2-2(50)	50 Tests	<div data-bbox="862 922 1115 963" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">DNA POL – HLA-C</div> <div data-bbox="862 975 1032 1016" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">HLA-C-</div>	1 x 60  1 x 880 	<div data-bbox="1330 922 1480 963" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX1F</div> <div data-bbox="1330 975 1480 1016" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX2F</div> <div data-bbox="1330 1027 1480 1069" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX3F</div> <div data-bbox="1330 1080 1480 1121" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX4F</div> <div data-bbox="1330 1133 1480 1174" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX5F</div> <div data-bbox="1330 1185 1480 1227" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX6F</div> <div data-bbox="1330 1238 1480 1279" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX7F</div>	<div data-bbox="1503 922 1653 963" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX1R</div> <div data-bbox="1503 975 1653 1016" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX2R</div> <div data-bbox="1503 1027 1653 1069" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX3R</div> <div data-bbox="1503 1080 1653 1121" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX4R</div> <div data-bbox="1503 1133 1653 1174" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX5R</div> <div data-bbox="1503 1185 1653 1227" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX6R</div>	Jeweils 1 x 110 

Kit	Katalognr.		PRE-PCR-Inhalt [†] (Anz. Ampullen)	POST-PCR-Inhalt (Anz. Ampullen)	
Klasse II					
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-</div>	1 x 10 ² 1 x 370 ² <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX3R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">RB-TG344-R</div>	Jeweils 1 x 44 ²
	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-</div>	1 x 20 ² 1 x 920 ² <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX3R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">RB-TG344-R</div>	Jeweils 1 x 110 ²
	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-</div>	1 x 10 ² 1 x 370 ² <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX3F-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX3R-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">RB-TG344-R</div>	Jeweils 1 x 44 ²
	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-</div>	1 x 20 ² 1 x 920 ² <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX3F-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">DRB1EX3R-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px;">RB-TG344-R</div>	Jeweils 1 x 110 ²

Kit	Katalognr.		PRE-PCR-Inhalt [†] (Anz. Ampullen)		POST-PCR-Inhalt (Anz. Ampullen)		
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2(20)	20 Tests	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1-	1 x 10 ² l 1 x 370 ² l	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R DQB1EX3R	Jeweils 1 x 44 ² l
	PQ-PD6.2-2(50)	50 Tests	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1-	1 x 20 ² l 1 x 920 ² l	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R DQB1EX3R	Jeweils 1 x 110 ² l
	AN-PD6.2-3(20)	20 Tests	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1-	1 x 10 ² l 1 x 370 ² l	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	Jeweils 1 x 44 ² l
	AN-PD6.2-3(50)	50 Tests	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1-	1 x 20 ² l 1 x 920 ² l	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	Jeweils 1 x 110 ² l
HLA-DPB1	HH-PD10.1(20)	20 Tests	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1-	1 x 10 ² l 1 x 370 ² l	DPB1EX2F	DPB1EX2R	Jeweils 1 x 44 ² l
	HH-PD10.1(50)	50 Tests	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1-	1 x 20 ² l 1 x 920 ² l	DPB1EX2F	DPB1EX2R	Jeweils 1 x 110 ² l

Kit	Katalognr.		PRE-PCR-Inhalt [†] (Anz. Ampullen)		POST-PCR-Inhalt (Anz. Ampullen)		
	KD-PD10.2-1(20)	20 Tests	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1-	1 x 10 μ l 1 x 370 μ l	DPB1EX1F DPB1EX2F DPB1EX3F DPB1EX4F DPB1EX5F PB-AG341-R	DPB1EX1R DPB1EX2R DPB1EX3R DPB1EX4R DPB1EX5R	Jeweils 1 x 44 μ l
	KD-PD10.2-1(50)	50 Tests	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1-	1 x 20 μ l 1 x 920 μ l	DPB1EX1F DPB1EX2F DPB1EX3F DPB1EX4F DPB1EX5F PB-AG341-R	DPB1EX1R DPB1EX2R DPB1EX3R DPB1EX4R DPB1EX5R	Jeweils 1 x 110 μ l

[†]Das PRE-PCR-Kit enthält eine Ampulle mit einer locuspezifischen PCR-Mischung (z. B. **HLA-A-**), bestehend aus PCR-Puffer, dNTPs, MgCl₂ und locuspezifischen PCR-Primern, zusammen mit einer Einzelampulle DNA-Polymerase (z. B. **DNA POL – HLA-**).

Das POST-PCR-Kit enthält Sequenzierungsprimer (z. B. **AEX1F**).

Anforderungen an die Lagerung

Die PRE- und POST-PCR-Schachteln können getrennt und in dafür vorgesehenen PRE- und POST-PCR-Tiefkühlschränken aufbewahrt werden. Bei Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Temperaturbereich von $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ akzeptabel) können die Kit-Komponenten bis zu dem auf den äußeren Kit-Behältern angegebenen Verfallsdatum verwendet werden und können bis zu 25 Frost-Tau-Zyklen standhalten.

Die beschleunigten Stabilitätstests für die Kits HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 und -DPB1 zeigten eine Haltbarkeit von zweieinhalb Jahren ab Herstellungsdatum bei Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bestätigende Echtzeittests wurden durchgeführt. Nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.

Um eine optimale Leistung des Kits zu gewährleisten, sollten die Kit-Komponenten vor der Verwendung aus dem Lagerort mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ entfernt und bei Raumtemperatur schnell aufgetaut werden. Die Kit-Komponenten, mit Ausnahme der Polymerase, sollten danach vorsichtig gevortext werden, um sicherzustellen, dass die Komponenten der einzelnen Röhren nach dem Auftauen entsprechend gemischt werden. Nach der Verwendung sollten die Kits/Komponenten sofort wieder auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zurückgebracht werden.

Nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien, Reagenzien und Geräte

PCR

1. Steriles Wasser
2. Elektronische oder mechanische Pipetten und aerosolbeständige Spitzen
3. Thermocycler mit beheiztem Deckel
Diese Kits wurden mit den folgenden Thermocyclern validiert:
MJ Research PTC 225 DNA Engine DYAD™, Thermocycler Applied Biosystems™ by Life Technologies™ Veriti™, Gene Amp® PCR System 9700 und Eppendorf Mastercycler® Pro.
Die Verwendung anderer Thermocycler mit diesen Kits erfordert eine Validierung durch den Benutzer.
4. 0,2 ml dünnwandige Thermocycling-Reaktionsröhrchen (Streifen mit 8 Kavitäten oder Platten mit 96 Kavitäten).
Verwenden Sie die für die Verwendung mit Ihrem Thermocycler empfohlenen.
5. Sterile 1,5-ml-Röhrchen
6. Steriler Arbeitsbereich, wie z. B. biologische Sicherheitswerkbank oder Haube.
7. Tischzentrifuge mit Plattenadaptern und einer Kapazität von bis zu 2500 x g
8. Vortex

Agarose-Gelelektrophorese

9. Agarose-Gelelektrophoreseapparat
10. 1%ige Agarose (molekularbiologische Qualität), TBE-Gel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid.
11. Ladepuffer
12. PCR-Marker, geeignet für den Bereich von 300–1300 bp
13. UV-Transilluminator

Reinigung des PCR-Produkts

14. ExoSAP (USB® ExoSAP-IT®, Kat.-Nr. 78200, für 100 Reaktionen oder Illustrat™ ExoProStar™, Kat.-Nr. US77702, für 100 Reaktionen)
15. 2 mM MgCl₂ (erhältlich bei CareDx Pty Ltd, Produktcode MgCl₂-1.0(50) oder MgCl₂-1.0(3000))
16. Schüttler

Die Verwendung alternativer PCR-Reinigungstechniken erfordert vor der Verwendung eine Validierung durch den Benutzer.

Sequenzierungsreaktion

17. BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 oder v1.1, Applied Biosystems™ by Life Technologies™.
18. 5x-Sequenzierungsreaktionspuffer (CareDx Pty Ltd, Produktcode SEQ BUF-2.0(400) oder SEQ BUF-2.0(5000)) oder BigDye® Terminator v3.1 oder v1.1 5X-Sequenzierungsreaktionspuffer, Applied Biosystems™ by Life Technologies™.

Reinigung von Sequenzierungsreaktionsprodukten

19. 125 mM EDTA, pH 8,0 (erhältlich bei CareDx Pty Ltd, Produktcode EDTA-3.0(200) oder EDTA-3.0(5000)).
20. Absolut- und 80%-Ethanol. Jeder Durchlauf erfordert frisch zubereitetes 80%-Ethanol bestehend aus Absolut-Ethanol und sterilem Wasser. VERWENDEN SIE KEIN DENATURIERTES ETHANOL (in einigen Ländern auch als Methylbenzol bekannt).

Die Verwendung alternativer Sequenzierungsreinigungstechniken erfordert vor der Verwendung eine Validierung durch den Benutzer.

Denaturierung und Elektrophorese von Sequenzierungsreaktionsprodukten

21. Hi-Di™-Formamid, Applied Biosystems™ by Life Technologies™, Produktcode 4311320
22. Automatisierter DNA-Sequenzierer und Zubehör (z. B. Applied Biosystems™ by Life Technologies™ ABI Prism® 3730), einschließlich Datenerfassung und Software.

Diese Kits wurden mit den Kapillarsequenzierern und der Software Applied Biosystems™ by Life Technologies™ 3100, 3730 und 3730xl getestet und validiert.

Die Verwendung anderer Denaturierungstechniken und Sequenzierungsplattformen erfordert vor der Verwendung eine Validierung durch den Benutzer.

23. HLA-Sequenzanalyse-Software (z. B. ASSIGN™ SBT, Version 4.7 oder höher, CareDx Pty Ltd).

Anforderungen an die Probe

1. Steriles Wasser (Negativ-/keine Templatekontrolle)
2. Humane genomische DNA mit hohem Molekulargewicht (Konzentrationsbereich von 20–100 ng/μL im Tris-/EDTA-Puffer und $OD_{260/280} > 1,8$), extrahiert aus antikoagulierten ACD- oder EDTA-Vollblutproben. Keine Vollblutproben verwenden, die Heparin enthalten.

Die verwendete DNA-Isolationsmethode muss vom Benutzer vor der Verwendung validiert werden.

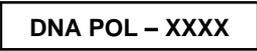


Warnungen und Sicherheitsvorkehrungen

- Dieses Kit muss von geschultem und befugtem Laborpersonal verwendet werden.
- Alle Proben, Geräte und Reagenzien müssen gemäß der guten Laborpraxis gehandhabt werden. Insbesondere sollte das gesamte Patientenmaterial als potenziell infektiös betrachtet werden. Die Verwendung von Handschuhen und Laborkitteln wird dringend empfohlen. Handhabung und Entsorgung des gesamten Probenmaterials gemäß den lokalen und nationalen Richtlinien.
- In den Komponenten des Kits sind KEINE gefährlichen Substanzen enthalten.
- Verwenden Sie Reagenzien NICHT über ihr Verfallsdatum hinaus.
- Die Verwendung von Kit-Komponenten aus verschiedenen Kit-Chargen wird NICHT empfohlen. Diese Verwendung kann die Leistung des Assays beeinträchtigen.
- Die Verwendung von Reagenzien, die nicht in diesem Kit enthalten sind oder nicht unter „Nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien, Reagenzien und Geräte“ aufgelistet sind, (z. B. alternative *Taq*-DNA-Polymerasen) wird NICHT empfohlen. Diese Verwendung kann die Leistung des Assays beeinträchtigen.
- Es sollte darauf geachtet werden, eine Kreuzkontamination von DNA-Proben zu verhindern. Wechseln Sie die Spitzen zwischen DNA-Proben.
- Pre- und Post-PCR-Tätigkeiten müssen physisch streng voneinander getrennt werden. Spezielle Geräte, Reagenzien und Laborkittel verwenden.
- Ethidiumbromid ist ein potenzielles Karzinogen. Bei der Vorbereitung und Handhabung von Gelen müssen stets Schutzhandschuhe getragen werden. Ethidiumbromid-Gele und -Puffer gemäß den lokalen und nationalen Richtlinien entsorgen.
- Vermeiden Sie beim Betrachten und Fotografieren von Agarose-Gelen unter UV-Licht stets direkte Exposition und verwenden Sie einen geeigneten UV-blockierenden Gesichtsschutz, Einweghandschuhe und Laborkittel.

Symbole

Es wurden die folgenden nicht standardmäßigen Symbole verwendet:

Symbol	Beschreibung
	Locusspezifische PCR-Mischung
	DNA-Polymerase
	HLA-A-Exon-1-Forward-Sequenzierungsprimer. Siehe „Zusammensetzung des Kits“ und Tabelle 4 für weitere Sequenzierungsprimer.
	Herstellungsdatum (erforderlich für nicht-EU-Märkte).

Verfahren

1. PCR

- 1.1. Für jeden zu amplifizierende Locus und für jede einzelne zu testende Probe muss eine separate PCR-Reaktion eingerichtet werden. Jeder Durchlauf sollte (eine) geeignete Positiv-Kontrolle(en) des bekannten Genotyps und mindestens eine Negativ-Kontrolle für jeden amplifizierten Locus umfassen.
- 1.2. Bereiten Sie bei jeder PCR-Durchführung eine frische Lösung der PCR-Mastermischung zu. Die locusspezifische PCR-Mischung bei Raumtemperatur schnell auftauen. Nach dem Auftauen kurz vortexen.
- 1.3. Dispensieren Sie das erforderliche Volumen von PCR-Mischung und DNA-Polymerase in ein steriles Röhrchen für die Anzahl der zu testenden Proben (siehe Tabelle 1 unten für das Volumen pro Reaktion). Die Lösung 3–4 Mal puls vortexen.

Locus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Locusspezifische PCR-Mischung	16,7 μ l					
z. B. HLA-A-						
DNA-Polymerase	1 μ l	1 μ l	1 μ l	0,3 μ l	0,3 μ l	0,3 μ l
z. B. DNA POL – HLA-A						

Tabelle 1: Zusammensetzung der pro Probe erforderlichen Mastermischung.

- 1.4. Dispensieren Sie 17 μ l der Mastermischung in jede Reaktionskavität.
- 1.5. Fügen Sie 3 μ l Proben-DNA oder (eine) entsprechende Positiv-Kontrolle(en) zu jeder Reaktionskavität hinzu. Fügen Sie 3 μ l steriles Wasser zur Reaktionskavität der Negativ-Kontrolle hinzu.
- 1.6. Versiegeln Sie die Reaktionskavitäten. Durch Vortexen vorsichtig mischen und kurz zentrifugieren.
- 1.7. Setzen Sie die Reaktionskavitäten in einen Thermocycler ein und führen Sie den Durchlauf gemäß den unten angegebenen Thermocycling-Bedingungen aus.

95 °C–10 Min.	}	33 Zyklen
96 °C–20 Sek.		
60 °C–30 Sek.		
72 °C–3 Min.		
15 °C– Halten		

- 1.8. Die Amplifikation dauert etwa 2,5 Stunden.
- 1.9. Wenn die PCR abgeschlossen ist, entfernen Sie die Reaktionskavitäten/-platten aus dem Thermocycler und fahren Sie direkt mit der Gelelektrophorese fort oder lagern Sie sie bei 4 °C, bis sie benötigt werden.

HINWEIS: Die Reinigung der Amplicons durch ExoSAP-Behandlung sollte innerhalb von 24 Stunden nach Abschluss der PCR erfolgen.

2. Agarose-Gelelektrophorese

- 2.1. Bestätigen Sie die erfolgreiche Amplifikation durch Agarose-Gelelektrophorese mit 2µl jedes PCR-Produkts in Kombination mit 5µl Ladebuffer (alternative Volumina des Ladebuffers sollten vor der Verwendung validiert werden). Es wird die Verwendung von 1%-Agarose-Gelen empfohlen.
- 2.2. Die Anzahl und die erwarteten Größen der resultierenden Amplicons variieren je nach Locus und Probengenotyp. Die erwarteten PCR-Amplikongrößen sind in Tabelle 2 angegeben.

Locus	Erwartete Bandgrößen
HLA-A	≈ 2 kbp
HLA-B	≈ 2 kbp
HLA-C	≈ 1,1 kbp und 1,4 kbp
HLA-DRB1	≈ 450 bp–850 bp (HH-PD5.2-5) ≈ 630 bp–980 bp (LG-PD5.2-7) Das Bandenmuster variiert je nach Vorhandensein spezifischer Allelgruppen
HLA-DQB1	≈ 300 bp und 500 bp (PQ-PD6.2-2) ≈ 400 bp und 500 bp (AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	≈ 400 bp (HH-PD10.1) ≈ 400 bp, ≈ 780 bp und ≈ 1470 bp (KD-PD10.2-1)

Tabelle 2: Erwartete Produktgrößen für jeden Assay.

3. Reinigung des PCR-Produkts

HINWEIS: Zur Reinigung dieser PCR-Produkte können andere Reinigungssysteme als ExoSAP-IT® oder ExoProStar™ (z. B. Agencourt® AMPure® XP oder säulenbasierte Systeme) verwendet werden. Es wird dringend empfohlen, dass die Benutzer diese Verfahren validieren, bevor sie fortfahren. Wenn die ExoSAP-Behandlung verwendet werden soll, wird empfohlen, dass die Benutzer das unten beschriebene Verfahren befolgen.

- 3.1. Bereiten Sie eine Mastermischung aus 4µl ExoSAP-IT® oder ExoProStar™ und 8µl 2 mM MgCl₂ pro zu reinigender Probe zu. Zum Mischen vorsichtig pulsvortexen. Dispensieren Sie 12µl der Mastermischung in die Reaktionskavität jeder reaktiven Probe. Versiegeln Sie die Kavitäten, vortexen Sie sie und setzen Sie sie danach in einen Schüttler ein oder vortexen Sie sie 2 Minuten lang vorsichtig. Vor dem Einsetzen in den Thermocycler kurz zentrifugieren. Führen Sie den Thermocycler gemäß dem folgenden Profil aus:

37 °C – 30 Min.
80 °C – 15 Min.
4 °C – Halten

- 3.2. Verdünnen Sie das gereinigte Produkt nach Abschluss im Verhältnis 1:4 mit sterilem Wasser. Durch diesen Verdünnungsschritt wird sichergestellt, dass genügend Template vorhanden sind, um die Sequenzierungsreaktionen durchzuführen und

dass die Konzentration des Templates ausreicht, um Sequenzdaten von guter Qualität zu erzeugen.

HINWEIS: Es kann ein höherer Verdünnungsfaktor (z. B. 1:8) erforderlich sein, wenn konstant hohe Signale und damit verbundenes Rauschen und damit verbundene Artefakte festgestellt werden. Schwächere PCR-Produkte erfordern möglicherweise einen niedrigeren Verdünnungsfaktor.

3.3. ExoSAP-behandelte Proben können bei 4°C gelagert werden, bis sie verwendungsbereit sind. Diese Proben können bis zu einer Woche vor der Verwendung bei 4°C gelagert werden, sollten jedoch für die langfristige Lagerung bei -20°C gelagert werden⁹.

4. Sequenzierungsreaktion

HINWEIS: In Fällen, in denen heterozygote Mehrdeutigkeiten mit hemizygoten Sequenzierungsprimern wie HARPS® aufgelöst werden sollen, lesen Sie bitte die Gebrauchsanweisung von OLERUP SBT™ HARPS®.

4.1. Tabelle 3 listet die Sequenzierungsprimer auf, die für die jeweiligen Loci verwendet werden sollen.

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 [†]		HLA-DQB1		HLA-DPB1	
DRB1EX2F	DRB1EX2R-2	DQB1EX2F	DQB1EX2R	DPB1EX2F	DPB1EX2R
DRB1EX3R-2 [^]	RB-TG344-R [†]	DQB1EX3F	DQB1EX3R		

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

Tabelle 3: Für die einzelnen Loci bereitgestellte Sequenzierungsprimer.

*RB-TG344-R ist ein HARP®, der auf den Codon-86-Dimorphismus gerichtet ist. Seine Verwendung ist optional.

*PB-AG341-R ist ein HARP®, der auf den Codon-85-Dimorphismus in DPB1 gerichtet ist. Seine Verwendung ist ebenfalls optional.

^DRB1EX3R-2 ist ein DRB1-Sequenzierungsprimer in den Kits HH-PD5.2-5, der sich ähnlich wie ein HARP verhält und für die Sequenzierung der folgenden Allelgruppen konzipiert ist: *03, *08, *11, *12, *13, *14, *15 und *16. Dieser Primer produziert entweder heterozygote, hemizygoter oder keine Sequenzierungsdaten, was vom Genotyp der typisierten Probe abhängig ist. Bei der Analyse von DRB1EX3R-2-Daten in ASSIGN™ im Vergleich zur DRB1-FullX2-Referenz werden die resultierenden Exon-3-Daten in einer separaten Schicht analysiert und diese Daten ermöglichen die Auflösung einer Reihe von Allelmehrdeutigkeiten in Exon 3, wie z. B. der Mehrdeutigkeit DRB1*14:01 vs. *14:54. Seine Verwendung ist optional, was von der vom Labor verwendeten Typisierungsstrategie abhängig ist. Dies gilt nicht für die Kits LG-PD5.2-7, da eine bidirektionale Sequenzierung für Exon 3 verfügbar ist.

4.2. Bereiten Sie jedes Mal, wenn eine Sequenzreaktion durchgeführt wird, eine frische Lösung der Sequenzierungsprimermischung auf Eis zu. Die Zusammensetzung und das Volumen für die unten angegebene Mischung sind **pro Probe** angegeben.

<u>Komponente</u>	<u>Menge</u>
Sequenzierungsprimer	2µL
Steriles Wasser	11,5µL
BigDye®-Terminatoren	1µL
5x-Seq-Rxn-Puffer	3,5µL

4.3. Mischen Sie jede Sequenzierungsreaktionsmischung vorsichtig durch Pulsvortexen.

4.4. Dispensieren Sie 18 µL der Sequenzierungsreaktionsmischung in jede entsprechende Reaktionskavität.

HINWEIS: Bei Durchläufen, bei denen nur wenige Proben mit vielen Sequenzierungsprimern verwendet werden, ist es akzeptabel, den Sequenzierungsprimer (2 µL) direkt in die einzelnen Reaktionskavitäten zu dispensieren. Anschließend kann eine Mastermischung aus sterilem Wasser, BigDye®-Terminatoren und 5x-Seq-Rxn-Puffer erstellt werden, von der 16 µL in jede Reaktionskavität dispensiert werden. Es wird dringend empfohlen, die Verwendung dieses alternativen Verfahrens vor der Implementierung durch den Benutzer zu validieren.

4.5. Fügen Sie 2 µL gereinigtes PCR-Produkt zu jeder entsprechenden Kavität hinzu.

HINWEIS: Es muss darauf geachtet werden, eine Kreuzkontamination von Sequenzreaktionen zu verhindern.

4.6. Versiegeln Sie die Reaktionskavitäten, mischen Sie vorsichtig und zentrifugieren Sie kurz, um sicherzustellen, dass sich der Inhalt an der Basis jeder Reaktionskavität befindet.

4.7. Setzen Sie die Reaktionskavitäten in einen Thermocycler ein und führen Sie den Durchlauf gemäß dem folgenden Profil aus:

Anzahl der Zyklen	Temperatur und Zeit
25	96 °C – 10 Sek. 50 °C – 5 Sek. 60 °C – 2 Min.
1	4 °C – Halten

- 4.8. Wenn das Programm abgeschlossen ist, entfernen Sie die Reaktionskavitäten/-platten aus dem Thermocycler und fahren Sie direkt mit der Reinigung der Reaktionsprodukte fort oder lagern Sie sie im Dunkeln bei 4°C, bis sie benötigt werden. Es wird empfohlen, die Proben zu reinigen und innerhalb von 24 Stunden mit dem DNA-Sequenzierer auszuführen.

5. Reinigung von Sequenzierungsreaktionsprodukten

HINWEIS: Die Reinigung der Reaktionsprodukte kann durch andere Verfahren als die hier beschriebene Ethanol-fällungsmethode erfolgen. Es wird dringend empfohlen, dass die Benutzer diese Verfahren validieren, bevor sie fortfahren.

- 5.1. Vor dem Fortfahren die Reaktionskavitäten/-platten kurz zentrifugieren. Wenn während des Thermocyclings wiederverwendbare Deckel/Kappen verwendet wurden, kennzeichnen Sie die Deckel/Kappen, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- 5.2. Die Versiegelungen vorsichtig entfernen.
- 5.3. Zu jeder Reaktionskavität 5 µL 125 mM EDTA, pH 8,0, hinzufügen. Stellen Sie sicher, dass das EDTA die Basis der Reaktionskavität erreicht.
- 5.4. Fügen Sie 60 µL 100%-Ethanol zu jeder Reaktionskavität hinzu. Versiegeln Sie die Kavitäten/Platte und vortexen Sie kurz, jedoch gründlich, um ein gründliches Mischen sicherzustellen.
- 5.5. Pelletieren Sie die Erweiterungsprodukte durch Zentrifugieren bei 2000 g für 45 Minuten. **FAHREN SIE SOFORT MIT DEM NÄCHSTEN SCHRITT FORT.** Wenn dies nicht möglich ist, führen Sie eine erneute Zentrifugation für weitere 10 Minuten durch, bevor Sie fortfahren.
- 5.6. Entfernen Sie die Versiegelungen an den Reaktionskavitäten und entsorgen Sie den Überstand, indem Sie die Reaktionskavitäten auf einem Papiertuch oder Papiertüchern umdrehen.
- 5.7. Setzen Sie die umgedrehten Reaktionskavitäten und das Papiertuch oder die Papiertücher in die Zentrifuge ein. 1 Minute lang bei 350 g zentrifugieren, um den Restüberstand zu entfernen.
- 5.8. Entfernen Sie die Reaktionskavitäten aus der Zentrifuge und stellen Sie sie aufrecht auf den Arbeitstisch. Entsorgen Sie das Papiertuch oder die Papiertücher.
- 5.9. Bereiten Sie frische Lösung aus 80%-Ethanol mit Absolut-Ethanol und sterilem Wasser zu.
- 5.10. Fügen Sie 60 µL 80%-Ethanol zu jeder Kavität hinzu. Kavitäten erneut versiegeln und kurz vortexen.

5.11. 5 Minuten lang bei 2000 g zentrifugieren.

5.12. Wiederholen Sie die Schritte 5.6 und 5.7.

5.13. Entfernen Sie die Reaktionskavitäten aus der Zentrifuge und entsorgen Sie das Papiertuch. Versiegeln Sie die Reaktionskavitäten erneut und fahren Sie mit dem Denaturierungsschritt fort. Ansonsten bei -20°C im Dunkeln lagern¹⁰. Es wird empfohlen, die Erweiterungsprodukte innerhalb von 24 Stunden nach der Einrichtung der Sequenzierungsreaktionen mit dem DNA-Sequenzierer auszuführen.

6. Denaturierung und Elektrophorese von Sequenzierungsreaktionsprodukten

HINWEIS: Das hier beschriebene Verfahren zur Denaturierung von Erweiterungsprodukten in Hi-Di™-Formamid ist unter Umständen nicht erforderlich, wenn andere Reinigungsverfahren als die Ethanol-fällung verwendet wurden. Es wird dringend empfohlen, dass die Benutzer alternative Verfahren validieren, bevor sie fortfahren.

6.1. Fügen Sie 12 μL Hi-Di™-Formamid zu jeder Reaktionskavität hinzu. Die Kavitäten/Platten kurz vortexen und zentrifugieren.

6.2. Inkubieren Sie die Reaktionskavitäten bei 98°C für 5 Minuten. Stellen Sie nach der Inkubation sicher, dass die Reaktionskavitäten schnell auf Raumtemperatur gekühlt werden (z. B. auf Eis legen oder den Thermocycler verwenden, um die Denaturierungs- und Kühle Schritte durchzuführen), bevor Sie sie in den Sequenzierer einsetzen. Sobald die Probe in Hi-Di-Formamid resuspendiert wurde, wird empfohlen, sie sofort in das Instrument zu laden. Die Probe ist im Instrument 24 Stunden lang stabil⁸.

HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass in den Reaktionskavitäten keine Luftblasen vorhanden sind. Diese können in die Kapillare eindringen und sie beschädigen.

6.3. Laden Sie die Reaktionskavitäten/-platten in den automatischen Sequenzierer und bereiten Sie die Datenerfassungsdatei gemäß den Herstellerspezifikationen des Sequenzierers vor.

6.4. Die folgenden Instrumentenparameter wurden vom Hersteller mit dem Big Dye®-Terminator-Sequenzierkit v3.1 und POP-7™ validiert. Diese Parameter erfordern möglicherweise eine Benutzervalidierung für andere Polymere, Sequenzierungschemien und Instrumente. Ausführliche Anweisungen und Anleitungen finden Sie im entsprechenden Benutzerhandbuch des Instruments (stellen Sie z. B. sicher, dass die Farbstoffeinstellung für die verwendete Chemie geeignet ist, z. B. ist für die Sequenzierung der Big Dye®-Terminator-Chemie nach Version 1.1 ein anderer Farbstoffsatz erforderlich).

Parameter	Einstellung
Farbstoffsatz	Z_BigDyeV3
Mobilitätsdatei	KB_3730_POP7_BDTV3
Basecaller	KB.bcp
Modullauf	Normal FastSeq50_POP7
Injektionszeit	15 Sek.

Laufzeit 3000 Sek.

- 6.5. Verwenden Sie die Datenerfassungssoftware des Instruments, um die gesammelten Rohdaten zu verarbeiten und die Sequenzdateien zu erstellen. Ausführliche Anweisungen und Anleitungen finden Sie im entsprechenden Benutzerhandbuch des Instruments.

7. Bearbeitung und Analyse von Elektropherogrammen

Die OLERUP SBT™-Kits werden mit der von CareDx Pty Ltd entwickelten Software OLERUP ASSIGN™ SBT konzipiert, entwickelt und validiert. Die Benutzer sollten die ASSIGN™ SBT-Versionen 3.6+ und höher verwenden (ASSIGN™ SBT V4.7 oder OLERUP ASSIGN™ SBT V471), da diese Versionen der Software speziell für die Typisierungskits und HARPS® von OLERUP SBT™ entwickelte Einstellungs- und Referenzdateien verwenden. Weitere Informationen zum Betrieb dieser Software finden Sie in den entsprechenden Benutzerhandbüchern, die auf der CareDx-Website zum Download zur Verfügung stehen (<http://www.CareDx.com>).

Die mit den OLERUP SBT™-Typisierungskits generierten sequenzierungsbasierten Typisierungsdaten sollten mit den folgenden ASSIGN™ SBT-Referenzdateien verglichen werden, die von CareDx Pty Ltd zur Verfügung gestellt werden:

Assay	Produktcode	ASSIGN-Referenzdatei
OLERUP SBT™ HLA-A	XH-PD1.1-2	A.xml
OLERUP SBT™ HLA-B	BS-PD2.1-2	B.xml
OLERUP SBT™ HLA-C	HH-PD3.2-2	C.xml oder Cw.xml
OLERUP SBT™ HLA-DRB1	HH-PD5.2-5	DRB1-FullX2.xml
	LG-PD5.2-7	527_DRB1.xml
OLERUP SBT™ HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2	DQB1.xml
	AN-PD6.2-3	623_DQB1.xml
OLERUP SBT™ HLA-DPB1	HH-PD10.1	DPB1.xml
	KD-PD10.2-1	DPB1.xml

Leistungsmerkmale

Genauigkeit

Panels von bis zu 93 Proben aus dem Leistungstestprogramm UCLA International DNA Exchange (2008–2010), die für interne Tests für die OLERUP SBT™-Kits verwendet wurden, ergaben folgende Ergebnisse:

Locus	Anzahl der getesteten Proben	Diagnostische Empfindlichkeit (% der erfolgreichen PCRs)	Diagnostische Spezifität (% der erhaltenen Genotypen)	Anzahl der nicht übereinstimmenden Proben	Anzahl der heterozygoten Proben	Anzahl der eindeutigen Allele
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

*Die beiden nicht übereinstimmenden Proben enthielten zusätzliche Sequenzinformationen außerhalb von Exon 2, die vom Leistungstestprogramm UCLA International DNA Exchange nicht berichtet wurden. Eine Probe enthielt 131:01, wurde vom Leistungstestprogramm UCLA International DNA Exchange jedoch als 13:01 berichtet. Die Allele unterscheiden sich in den Exonen 3 und 4. Die andere Probe enthielt 107:01, wurde vom Leistungstestprogramm UCLA International DNA Exchange jedoch als 13:01 berichtet. Diese Allele unterscheiden sich in Exon 1.

Für die Kits OLERUP SBT™ HLA-DRB1 (Produktcode LG-PD5.2-7) wurde ein Panel mit 23 gut charakterisierten Proben verwendet, das eine breite Palette von Allelen für interne Tests abdeckt. Zusätzlich wurde ein Panel mit 293 extern bezogenen Proben ohne *vorherige* Kenntnis anderer HLA-Typisierungsdaten typisiert. Diese Proben wurden ebenfalls mit dem Assay OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2) getestet. In den Fällen, in denen ein homozygoten Ergebnis erzielt wurde, wurden die DQB1/DRB1-Assoziationen für diese Proben untersucht, um das Ergebnis zu bestätigen und um Fälle zu detektieren, in denen ein Allelausfall aufgetreten sein könnte.

Die Tests ergaben folgende Ergebnisse:

Locus	Anzahl der getesteten Proben	Diagnostische Empfindlichkeit	Diagnostische Spezifität	Anzahl der nicht übereinstimmenden Proben	Anzahl der heterozygoten Proben	Anzahl der eindeutigen Allele
-------	------------------------------	-------------------------------	--------------------------	---	---------------------------------	-------------------------------

		eit		menden Proben		
HLA-DRB1	23	100 %	100 %	0	23	12
	286*	97,9 %	99,6 %	0	253	33

*Sechs Proben konnten aufgrund von DNA-Proben in schlechter Qualität nicht amplifiziert werden. Es wurde festgestellt, dass eine Probe kontaminierende DNA enthielt, deren Quelle in dem Labor auftrat, von dem die Proben bezogen wurden. Aufgrund der Kontamination konnte für diese Probe kein Genotyp gewonnen werden.

Die Sequenzanalyse von PCR- und Sequenzierungsprimerstellen und Leistungsevaluierungsstudien haben keine häufigen und gut dokumentierten Allele identifiziert, die nicht durch die empfohlene Verwendung dieser Kits amplifiziert wurden. Weitere Informationen finden Sie im Dokument *OLERUP SBT™ Primer Analysis (Primeranalyse)*, das mit jeder Referenzversion von OLERUP ASSIGN™ SBT verfügbar ist und von der CareDx-Website heruntergeladen werden kann (<http://www.CareDx.com>).

Nachweisgrenze

Die empfohlene Konzentration der menschlichen genomischen DNA mit hohem Molekulargewicht beträgt 20–100 ng/µl. Interne Tests haben gezeigt, dass Proben mit Konzentrationen von bis zu 5 ng/µl ebenfalls verwendet werden können. Korrekte Genotypen wurden ebenfalls von DNA in schlechter Qualität oder fragmentierter DNA gewonnen.

Spezifität

Die OLERUP SBT™-Kits von CareDx Pty Ltd sind locuspezifische Assays. Die Verwendung der Kits gemäß diesen Anweisungen sollte nur einen einzelnen Locus amplifizieren. In den meisten Fällen führt die Verwendung der in jedem Kit enthaltenen Sequenzierungsprimer zu einer HLA-Typisierung für die meisten Proben, ohne dass eine weitere Auflösung erforderlich ist. In Fällen, in denen heterozygote Mehrdeutigkeiten bestehen bleiben, wird die Verwendung von Auflösungs-Sequenzierungsprimern (wie OLERUP SBT™ HARPS®) empfohlen.

Es ist zu beachten, dass Mutationen an Amplifikations- oder Sequenzierungsprimerstellen möglich sind und zu Allelausfall führen können. Proben, die auf ein homozygoten Typisierungsergebnis hindeuten, müssen durch alternative Verfahren bestätigt werden.

Störsubstanzen

CareDx Pty Ltd hat alle bekannten potenziellen Störsubstanzen identifiziert, die den Test beeinträchtigen könnten. Siehe Tabelle unten.

Inhibitor	Potenzielle Quelle	Risiko	Kommentare
EDTA	TE-Puffer, Blutentnahmeröhrchen	Sehr niedrig	DNA in Tris-HCl pH 8 oder TE mit <1 mM EDTA neu suspendieren. Verwenden Sie handelsübliche Blut-DNA-Präparationskits und/oder vermeiden Sie EDTA-Blutentnahmeröhrchen
Alkohole	Ethanol, Isopropanol, Isoamylalkohol	Niedrig	Stellen Sie sicher, dass die DNA-Pellets oder -Beads luftgetrocknet und visuell auf Ethanoltröpfchen geprüft werden (1 % Ethanol = 1,25 µL 80%-Ethanol in einer

Inhibitor	Potenzielle Quelle	Risiko	Kommentare
			100-µL-PCR-Reaktion).
Überschüssige Salze	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Sehr niedrig	Eine gründliche Reinigung der DNA-Pellets oder -Beads mit 80%-Ethanol sicherstellen. Sicherstellen, dass OD 230/260 mit genomischer DNA ~2 beginnt
Chaotrope Salze	Guanidin Cl; MgCL ₂ ; Harnstoff	Sehr niedrig	Eine gründliche Reinigung der DNA-Pellets oder -Beads mit 80%-Ethanol sicherstellen. Sicherstellen, dass OD 230/260 mit genomischer DNA ~2 beginnt
Phenol:Chloroform	Organische Verschleppung	Sehr niedrig	Ein Bestandteil des weit verbreiteten handelsüblichen Trizol-DNA-Extraktionsverfahrens. Eine gründliche Reinigung der DNA-Pellets oder -Beads mit 80%-Ethanol sicherstellen. Sicherstellen, dass OD 230/260 mit genomischer DNA ~2 beginnt
Proteine	BSA, PEG, Blutalbumin	Sehr niedrig	Verwenden Sie handelsübliche Blut-DNA-Präparationskits. Sicherstellen, dass OD 260/280 mit genomischer DNA >1,8 beginnt
Häm, Hämoglobin, Immunglobuline	Blut	Sehr niedrig	Vermeiden Sie die Verwendung von Blutproben mit grober Hämolyse. Verwenden Sie handelsübliche Blut-DNA-Präparationskits. Sicherstellen, dass OD 260/280 mit genomischer DNA >1,8 beginnt
Reinigungsmittel/DDT	Na-Deoxycholat, Sarkosyl, SDS, NP40, Tween 20, Triton-X-100, N-Octylglucosid	Sehr niedrig	Eine gründliche Reinigung der DNA-Pellets oder -Beads mit 80%-Ethanol sicherstellen. Sicherstellen, dass OD 230/260 mit genomischer DNA ~2 beginnt
Proteasen	Proteinase K, Probenhandhabung	Sehr niedrig	Verwenden Sie handelsübliche DNA-Präparationskits für Blut oder Speichel. Tragen Sie stets Handschuhe
Nukleasen	Probenhandhabung, Restriktionsenzyme, Mikrokokken-Nuklease	Sehr niedrig	Verwenden Sie handelsübliche Blut-DNA-Präparationskits. Tragen Sie stets Handschuhe
Exogene DNA/RNA	Verschleppung, Kontamination	Sehr niedrig	Bereiten Sie genomische DNA in einem speziell dafür vorgesehenen Pre-PCR-Bereich vor
Träger	RNA, Heparin, Glykogen	Sehr niedrig	Verwenden Sie handelsübliche Blut-DNA-Präparationskits und/oder vermeiden Sie Heparin-Blutentnahmeröhrchen
Überschüssige Metallionen	Mg ²⁺ aus PCR-Puffer, Fe-Ionen	Sehr niedrig	Eine gründliche Reinigung der DNA-Pellets oder -Beads mit 80%-Ethanol sicherstellen. Sicherstellen, dass OD 230/260 mit genomischer DNA ~2 beginnt
Antivirale Medikamente (z. B. Acyclovir)	Blut	Sehr niedrig	Verwenden Sie handelsübliche Blut-DNA-Präparationskits. Sicherstellen, dass OD 260/280 mit genomischer DNA >1,8 beginnt
Handschuhpuder	Gepuderte Handschuhe	Sehr niedrig	Verwenden Sie puderfreie Handschuhe
UV-bestrahlte PCR-Röhrchen	UV-Behandlung der PCR-Röhrchen	Sehr niedrig	Vermeiden Sie die UV-Behandlung von Kunststoffprodukten

Beschränkungen und Sicherheitsvorkehrungen

- Es wird dringend empfohlen, diese Kits vor der Implementierung im Labor durch den Benutzer mit Proben zu validieren, deren HLA-Typ durch andere molekularbasierte Verfahren bestimmt wurde. Insbesondere sind Abweichungen von diesem Verfahren (z. B. die Verwendung alternativer PCR- oder DNA-Sequenzierungsverfahren) vor der Implementierung durch den Benutzer zu validieren.
- Diese Kits wurden mit Panels von Proben validiert, deren Genotypen eine breite Palette von Allelen abdecken. Es ist jedoch zu beachten, dass seltene Allele und Allele mit Polymorphismen in Amplifikations- und Sequenzierungsprimerstellen auftreten können und dass diese möglicherweise nicht amplifiziert oder sequenziert werden können.
- Die HLA-sequenzbasierte Typisierung ist derart, dass andere Faktoren als die PCR-Mischung zu einer präferenziellen Amplifikation oder einem Allelausfall führen können. Als Folge sollten scheinbare homozygote Typisierungsergebnisse mit alternativen Methoden und/oder Familiengenotypisierung bestätigt werden.
- Jeder PCR-Durchlauf muss eine Positiv-Kontrolle (menschliche DNA) und eine Negativ-Kontrolle (steriles Wasser) umfassen. Die Positiv-Kontrolle muss ein PCR-Produkt der entsprechenden Größe in Abhängigkeit vom amplifizierten Locus erzeugen und die resultierende Sequenz muss dem Genotyp der Probe entsprechen. Es dürfen bei keinem Experiment PCR-Produkte in der Negativ-Templatekontrolle enthalten sein. Wenn ein Band evident ist, kann eine gewisse Kontamination aufgetreten sein und muss der Durchlauf wiederholt werden.
- Gelegentlich können schwächere PCR-Produkte evident sein. Diese zusätzlichen Bänder beeinträchtigen weder die Sequenzergebnisse noch die Qualität.

Lizenz

Die OLERUP SBT™-Kits enthalten GoTaq® Hot Start Polymerase (DNA POL), die von Promega Corporation für den Vertrieb durch CareDx Pty Ltd hergestellt wird und an Promega unter den US-Patentnummern 5.338.671 und 5.587.287 und deren entsprechenden ausländischen Patenten lizenziert ist.

Bibliographie

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+ Bedienerhandbuch*, CareDx Pty Ltd
4. *ASSIGN™ SBT v4.7 Bedienerhandbuch*, CareDx Pty Ltd
5. *OLERUP ASSIGN™ SBT v471 Bedienerhandbuch*, CareDx Pty Ltd
6. Weitere Informationen zum DNA-Austauschprogramm der UCLA finden Sie unter: <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm>.
7. Aktuelle HLA-Allele finden Sie auf <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.
8. Website von Thermo Fisher (<https://www.thermofisher.com/search/results?query=4311320&persona=DocSupport&type=Product+FAQs>, Antwort-ID: E15311)
9. Current Protocols in Molecular Biology (2001)3, Unit 15.2.5
10. Website von Thermo Fisher: <https://www.thermofisher.com/au/en/home/technical-resources/technical-reference-library/capillary-electrophoresis-applications-support-center/sanger-sequencing-support/sanger-sequencing-support-getting-started.html>
11. Gillio-Meina C, Cepinkas G, Cecchini EL., Fraser DD, *Translational Research in Pediatrics II: Blood Collection, Processing, Shipping, and Storage*, Pediatrics, April 2013, **131**, 4.
12. Sidstedt M *et al*, (2018): *Inhibition mechanisms of haemoglobin G, and whole blood in digital and real-time PCR*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **410**, 2569-2583.
13. Schraider C *et al*. (2012): *PCR inhibitors – occurrence, properties and removal*, Journal of Applied Microbiology, **113**, 1014-1026.
14. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. *PCR inhibitors – occurrence, properties and removal*. 2012 J Appl Micro. 113:1014-26 (siehe auch Zitate darin)
15. Demeke T, Jenkins GR. *Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits*. Anal Bioanal Chem. 2009 396:1977-90.
16. Wilson IG. *Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification*. 1997 Appl Environ Micro. 63:3741-51 (siehe auch Zitate darin)
17. Al-Soud WA, Rådström P. *Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples*. Appl Env Micro. 1998 64:3748-53
18. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, Vallone PM, Rådström P. *Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR*. Anal Bioanal Chem. 2018 410:2569-83
19. Al-Soud WA, Rådström P. *Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells*. J Clin Micro. 2001 39:485-93
20. Yedidag EN, Koffron AJ, Mueller KH, Kaplan B, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart FP, Abecassis M. *Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus*. Transplantation. 1996 27;62(2):238-42
21. de Lomas JG, Sunzeri FJ, Busch MP. *False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder*. Transfusion. 1992 32:83-5.
22. Burgess LC, Hall JO. *UV Light Irradiation of Plastic Reaction Tubes Inhibits PCR*. Biotechniques. 1999 27:252-57.
23. Picelli S, Bjorklund AK, Reinius B, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. *Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects*. Genome Res. 2014 24:2033-44
24. Steiniger M, Adams CD, Marko JF, Reznikoff WS. *Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding*. Nucl Acid Res. 2006 34:2920-34.
25. *CareDx cfDNA Interfering Substances report* 2018

Fehlerbehebung

Problem	Mögliche Ursache(n)	Lösung
Kein oder schwaches PCR-Produkt	DNA in schlechter Qualität	Bewerten Sie die DNA-Qualität durch Gelelektrophorese. Intakte DNA sollte etwa 3 kb sein und wenig oder keine Anzeichen von Verschmierungen auf dem Gel aufweisen. DNA erneut extrahieren und PCR nach Möglichkeit wiederholen.
	Unzureichende Menge an DNA zur PCR hinzugefügt.	Überprüfen Sie, ob die DNA-Konzentration zwischen 20–100 ng/µl liegt. DNA erneut extrahieren und PCR nach Möglichkeit wiederholen.
	Vorhandensein von PCR-Inhibitoren in genomischer DNA	PCR-Inhibitoren sind in allen Körperflüssigkeiten vorhanden, einschließlich Blut, Serum und Plasma. PCR-Inhibitoren stellen eine vielfältige Gruppe von Substanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Wirkmechanismen dar. Die häufigsten Inhibitoren im Blut sind Hämoglobin, IgG und Lactoferrin. Darüber hinaus können Hormone oder antivirale Substanzen wie Acyclovir sowie einige Antibiotika die Genamplifikation ebenfalls beeinflussen ^{12,13} . Verwenden Sie keine Vollblutproben, die Heparin enthalten. Einzelheiten finden Sie in den referenzierten Manuskripten ^{12,13} . EDTA: Kann Mg ²⁺ -Konzentrationen verändern und kann die DNA-Polymerase bei bestimmten Konzentrationen inhibieren ¹³ . Generell führen Na-Citrat-Röhrchen zu hochwertiger DNA ¹¹ . DNA-Extraktions-/Reinigungsmethoden können PCR-Inhibitoren effizient entfernen. Der Kunde sollte die DNA-Extraktions-/Reinigungsmethoden evaluieren, um die Reinheit der Probe sicherzustellen. DNA erneut extrahieren und PCR nach Möglichkeit wiederholen.
	DNA-Polymerase nicht zur Mastermischung hinzugefügt oder unzureichendes Mischen der Mastermischung vor der Zugabe zu Proben.	PCR wiederholen. Sicherstellen, dass die Bestandteile der Mastermischung durch Vortexen ausreichend hinzugefügt und gemischt werden.
	Probleme beim Thermocycling	Parameter für den Thermocycling-Durchlauf prüfen. Überprüfen Sie die Durchlaufhistorie, um sicherzustellen, dass der Durchlauf nicht vorzeitig beendet wurde.

		Stellen Sie sicher, dass der Thermocycler gemäß den Herstellerspezifikationen betrieben und regelmäßig gewartet wird.
	Kein Gel zum Ethidiumbromid hinzugefügt.	Tauchen Sie das Gel in ein Färbebad mit 1X FSME und 0,5 mg/ml Ethidiumbromid. Vor der Aufnahme des Gelbilds in 1X FSME entfärben. Stellen Sie sicher, dass dem Gel vor dem Gießen Ethidiumbromid hinzugefügt wird.
	DNA-Proben werden in Wasser eluiert oder verdünnt, das einen leicht sauren pH-Wert aufweisen kann.	Verwenden Sie nach Möglichkeit steriles Wasser mit einem neutralen pH-Wert.
Kein oder schwaches PCR-Produkt für das Exon-3-5-Band beim KD-PD10.2-1-Assay	DNA in schlechter Qualität	Die Amplifikation von Proben sehr schlechter Qualität kann zu einer schwachen Amplifikation des Exon-3-5-Amplicons führen. Die Typisierung kann mit Sequenzdaten von Exon 1 und 2 weiterhin erreicht werden. Alternativ DNA erneut extrahieren und PCR nach Möglichkeit wiederholen.
Falsche Bandgrößen	Falsches Kit verwendet	Prüfen Sie, ob das richtige Kit verwendet wird.
	Falsches Thermocycling-Programm verwendet.	Prüfen Sie die Thermocycling-Parameter.
	PCR-Kontamination	Prüfen Sie die Negativ-Kontrolle auf Anzeichen einer Kontamination. Arbeitsbereich dekontaminieren und PCR wiederholen. PCR wiederholen, um die Kontaminationsquelle zu identifizieren. Verwendung eines frischen Kits in Betracht ziehen. Wenn die genomische DNA einer Probe kontaminiert zu sein scheint, extrahieren Sie sie erneut oder beschaffen Sie eine alternative DNA-Quelle.
Schwache Signalintensität von Elektropherogrammen	Schwaches PCR-Produkt	Gelbild prüfen. Die Sequenzierung schwacher PCR-Bänder wird NICHT empfohlen, da die Sequenzqualität für SBT möglicherweise nicht ausreicht. Ziehen Sie die Verwendung eines niedrigeren Verdünnungsfaktors (z. B. 1:2, 1:3) nach der PCR-Reinigung in Betracht.
	Zu wenig Reaktionsprodukte auf Sequenzer angewendet.	Sequenzparameter prüfen. Injektionszeit und Spannung müssen möglicherweise erhöht werden.
	Probleme bei der Reinigung von Sequenzerprodukten	Beim Entfernen des Überstands äußerste Vorsicht walten lassen, da dies das Pellet verlagern kann.
Die Signalintensität ist zu hoch (hoch-	Zu viel PCR-Produkt	Gelbild prüfen. Höheren Verdünnungsfaktor nach der PCR-

fluoreszierende Peaks – Artefakte vorhanden)		Reinigung in Betracht ziehen. Überprüfen Sie die Menge der DNA-Polymerase, die in der PCR verwendet wird.
	Zu viel Reaktionsprodukte auf Sequenzer angewendet.	Instrumentenparameter prüfen. Verringerung der Injektionszeit und Spannung in Betracht ziehen.
Verrauschte Basislinie (hoher Hintergrund)	Kontaminiertes PCR-Produkt	Siehe oben aufgelistete Korrekturmaßnahmen.
	Amplifikation von eng verwandten HLA-Genen	Thermocycling-Parameter prüfen.
	Schlechte PCR-Reinigung	Stellen Sie sicher, dass die ExoSAP-Behandlung gemäß den Anweisungen des Kits durchgeführt wird. Stellen Sie sicher, dass die PCR-Mischung gründlich mit ExoSAP gemischt wird Ziehen Sie die Verwendung von ExoSAP nach dem Verfahren des Herstellers (Erhöhung der Menge an Enzym) oder eine alternative Reinigungstechnik in Betracht.
	Kontaminierte Sequenzierungsreaktionen	Stellen Sie sicher, dass alle Maßnahmen ergriffen werden, um Kreuzkontaminationen zu verhindern. Pipettenspitzen nach Möglichkeit austauschen. Fügen Sie Flüssigkeiten oben in die Reaktionskavitäten ein. Aerosole vermeiden.
	Kontaminierte Sequenzierungsprimer	Prüfen Sie die Sequenzqualität der anderen Sequenzierungsprimer und anderer Proben mit dem gleichen Primer. Ziehen Sie die Verwendung eines frischen Aliquots des Sequenzierungsprimers in Betracht.
	Farbstoff-Terminator-Mischung oder Sequenzierungspuffer verunreinigt	Wiederholen Sie die Sequenzierung mit frischem Aliquot der Reagenzien.
	Schlechte Reinigung von Sequenzierungsprodukten.	Wiederholen Sie die Sequenzierung und stellen Sie sicher, dass die Reinigung gemäß den Anweisungen des Herstellers erfolgt.
Vorhandensein von Farbflecken	Schlechte Reinigung von Sequenzierungsprodukten	Reinigen Sie die Produkte gemäß den Anweisungen des Kits. Achten Sie darauf, dass die Produkte ausreichend mit 80%-Ethanol gewaschen werden.

Verwandte Produkte

CE-gekennzeichnete IVDs:

ASSIGN™ SBT 3.6+ Produktcode: CGX0036+

ASSIGN™ SBT v4.7 Produktcode: CGX00470

OLERUP ASSIGN™ SBT v471 Produktcode: CGX00471

OLERUP SBT™ HARPS®

Eine vollständige Produktliste finden Sie in der Gebrauchsanweisung von OLERUP SBT™ HARPS®

Nur für Forschungszwecke:

OLERUP SBT™ HLA-Typisierungskits

AN-PD11.0-0(20) OLERUP SBT™ HLA-DRB3-Kit (20 und 50 Tests)
AN-PD11.0-0(50)

AN-PD12.0-0(20) OLERUP SBT™ HLA-DRB4-Kit (20 und 50 Tests)
AN-PD12.0-0(50)

AN-PD13.0-0(20) OLERUP SBT™ HLA-DRB5-Kit (20 und 50 Tests)
AN-PD13.0-0(50)

LC-PD2.9(20) OLERUP SBT™ HLA-B57-Kit (20 und 50 Tests)
LC-PD2.9(50)

Hinweis: Die oben aufgelisteten Produkte sind in Australien als IVDs lizenziert

Allgemeine Laborreagenzien

MgCl₂ – 1.0(50) 2 mM MgCl₂
MgCl₂ - 1.0(3000))

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

EDTA – 3.0(200) 125 mM EDTA, pH 8,0
EDTA – 3.0(5000)

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrem lokalen Händler.



Selbstzertifizierte Kits:

HH-PD3.2-2(20) OLERUP SBT™ HLA-C-Kit (20 und 50 Tests)

HH-PD3.2-2(50)

PQ-PD6.2-2(20) OLERUP SBT™ HLA-DQB1-Kit (20 und 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 und 50 Tests)

HH-PD10.1(50)

KD-PD10.2-1(20)
KD-PD10.2-1(50)

Kontaktinformationen

Hersteller

CareDx Pty Ltd
PO Box 1294
Fremantle 6959
Western Australia
Australien
Tel.: +61-08-9336-4212
E-Mail: orders-aus@caredx.com
Website: www.CareDx.com

Informationen zu Support und Bestellung finden Sie auf der CareDx-Website (<http://www.caredx.com>).