

Kits de typage HLA

Mode d'emploi

Amplification par PCR et séquençage des Loci HLA de Classe I et II

N° de version : 1.4
Date d'édition : 27 mai 2020

IVD



CareDx Pty
20 Collie St.
Fremantle 6160
Australie-Occidentale
Australie



Qarad bvba
Cipalstraat 3
B-2440 Geel
Belgique

Table des matières

PRINCIPE	3
DOMAINE D'APPLICATION	3
COMPOSITION DU KIT	4
CONDITIONS DE STOCKAGE	9
MATERIELS, REACTIFS ET INSTRUMENTS NON FOURNIS	10
EXIGENCES APPLICABLES AUX ECHANTILLONS	11
MISES EN GARDE ET MESURES DE SECURITE	12
SYMBOLES	12
PROCEDURE	13
1. PCR	13
2. ÉLECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	13
3. PURIFICATION DU PRODUIT DE PCR	14
4. REACTION DE SEQUENÇAGE	15
5. PURIFICATION DES PRODUITS DE REACTION DE SEQUENÇAGE	17
6. DÉNATURATION ET ELECTROPHORÈSE DES RÉACTIONS DE SEQUENÇAGE	17
7. MODIFICATION ET ANALYSE DES ÉLECTROPHORÉGRAMMES	18
CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE	20
PRECISION	20
LIMITE DE DETECTION	21
SPECIFICITE.....	21
SUBSTANCES INTERFERENTES	21
LIMITATIONS ET PRECAUTIONS	23
LICENCE	23
BIBLIOGRAPHIE	24
RESOLUTION DE PROBLEME	25
PRODUITS ASSOCIES	27
OLERUP SBT™ HARPS®	28
COORDONNEES	29

Principe

La technique de typage HLA SBT (Sequence Based Typing) par la méthode de Sanger a été développée à l'origine par D. Sayer en 2001¹ et devenue un seul essai en tube en 2004². La procédure met en œuvre l'amplification initiale d'une séquence-cible suivie d'un traitement enzymatique destiné à supprimer les amorces et les dNTP non incorporés. L'amplicon est ensuite utilisé comme modèle pour le séquençage automatisé direct de l'ADN fluorescent en utilisant des amorces de séquençage personnalisées et la chimie de séquençage Big Dye® Terminator disponible sur Applied Biosystems™ by Life Technologies™. Les produits de séquençage sont ensuite purifiés par une méthode de précipitation à l'éthanol et dénaturés à l'aide de formamide Hi-DiT™ (Applied Biosystems™ by Life Technologies™) avant séparation et détection sur un séquenceur d'ADN automatisé à fluorescence. Il est recommandé d'analyser les données obtenues à l'aide du logiciel ASSIGN™ SBT d'analyse de séquence de CareDx Pty Ltd³⁻⁵.

Domaine d'application

Les kits HLA SBT OLERUP SBT™ de CareDx Pty Ltd sont utilisés dans le typage des gènes HLA Classe I (HLA-A, -B et -C) et Classe II (HLA-DRB1, -DQB1 et -DPB1) en laboratoire au départ d'ADN génomique. Chaque kit contient des réactifs qui facilitent l'amplification par PCR et le séquençage ADN d'un gène donné. Les données de séquençage obtenues sont alors interprétées à l'aide du logiciel ASSIGN™ SBT de CareDx Pty Ltd. Il convient de noter que ces kits SBT n'interviennent pas dans le diagnostic de maladies. Ils peuvent être utilisés dans le cadre du processus qui permet d'établir la compatibilité entre un donneur et du receveur. Le test est un test de séquençage d'ADN qui produit une séquence ADN de la partie d'un gène du système HLA. Le dispositif doit être utilisé par du personnel qualifié qui connaît la fréquence des types HLA dans leur population. Les tests doivent être réalisés dans des laboratoires réglementés.

Composition du kit

Kit	Référence catalogue		Contenu PRE-PCR [†] (Nombre de tubes)		Contenu POST-PCR (Nombre de tubes)		
Classe I							
HLA-A	XH-PD1.1-2(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-A</div>	1 x 25  1 x 352 	<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  chacun	
	XH-PD1.1-2(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-A</div>	1 x 60  1 x 880 	<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  chacun	
HLA-B	BS-PD2.1-2(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-B</div>	1 x 25  1 x 352 	<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  chacun	
	BS-PD2.1-2(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-B</div>	1 x 60  1 x 880 	<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  chacun	

Kit	Référence catalogue		Contenu PRE-PCR [†] (Nombre de tubes)	Contenu POST-PCR (Nombre de tubes)		
Classe II						
HLA-DRB1	HH-PD5.2-5(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-DRB1</div>	1 x 10  1 x 370 	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> </div>	1 x 44  chacun
	HH-PD5.2-5(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-DRB1</div>	1 x 20  1 x 920 	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> </div>	1 x 110  chacun
	LG-PD5.2-7(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-DRB1</div>	1 x 10  1 x 370 	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-top: 5px;">RB-TG344-R</div>	1 x 44  chacun
	LG-PD5.2-7(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-DRB1</div>	1 x 20  1 x 920 	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-top: 5px;">RB-TG344-R</div>	1 x 110  chacun
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2(20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – DQB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-DQB1</div>	1 x 10  1 x 370 	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> </div>	1 x 44  chacun
	PQ-PD6.2-2(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – DQB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-DQB1</div>	1 x 20  1 x 920 	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <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> </div>	1 x 110  chacun

Kit	Référence catalogue		Contenu PRE-PCR [†] (Nombre de tubes)		Contenu POST-PCR (Nombre de tubes)		
	AN-PD6.2-3(20)	20 tests	ADN POL – DQB1 MIX HLA-DQB1	1 x 10  1 x 370 	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 44  chacun
	AN-PD6.2-3(50)	50 tests	ADN POL – DQB1 MIX HLA-DQB1	1 x 20  1 x 920 	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 110  chacun
HLA-DPB1	HH-PD10.1(20)	20 tests	ADN POL – DPB1 MIX HLA-DPB1	1 x 10  1 x 370 	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1 x 44  chacun
	HH-PD10.1(50)	50 tests	ADN POL – DPB1 MIX HLA-DPB1	1 x 20  1 x 920 	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1 x 110  chacun
	KD-PD10.2-1(20)	20 tests	ADN POL – DPB1 MIX HLA-DPB1	1 x 10  1 x 370 	DPB1EX1F DPB1EX2F DPB1EX3F DPB1EX4F DPB1EX5F PB-AG341-R	DPB1EX1R DPB1EX2R DPB1EX3R DPB1EX4R DPB1EX5R	1 x 44  chacun

Kit	Référence catalogue		Contenu PRE-PCR [†] (Nombre de tubes)		Contenu POST-PCR (Nombre de tubes)		
	KD-PD10.2-1(50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">ADN POL – DPB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MIX HLA-DPB1</div>	1 x 20  1 x 920 	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">DPB1EX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">DPB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">DPB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">DPB1EX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">DPB1EX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">PB-AG341-R</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">DPB1EX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">DPB1EX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">DPB1EX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">DPB1EX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-right: 5px; margin-bottom: 5px;">DPB1EX5R</div>	1 x 110  chacun

[†]Le kit PRE-PCR est composé d'un tube de mix PCR locus-spécifique (ex.

MIX HLA-A

) avec tampon PCR, dNTP et MgCl₂ et amorces PCR spécifiques au locus, avec un tube d'enzyme d'ADN polymérase (ex.

ADN POL – HLA-

).

Le kit POST-PCR est composé des amorces de séquençage (ex.

AEX1F

).

Conditions de stockage

Les boîtes PRE et POST-PCR peuvent être séparées et stockées dans des congélateurs dédiés. Les kits conservés à -20 °C (une plage de température comprise entre -15 °C et -25 °C est acceptable), peuvent être utilisés jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage extérieur du kit et tolérer jusqu'à 25 cycles de congélation/décongélation.

Les études de stabilité accélérées réalisées pour les kits HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQB1 et -DPB1 ont démontré que les kits conservés à -20 °C ont une durée de vie de 2,5 ans. Néanmoins, puisque des tests en temps réel sont en cours, il est recommandé de ne pas utiliser les kits au-delà de leur date d'expiration.

Pour garantir une performance optimale, les composants du kit doivent être décongelés rapidement à température ambiante^o lorsqu'ils quittent leur zone de stockage à -20 °C. Ces composants, hormis la polymérase, doivent tous être vortexés pour assurer une homogénéité parfaite après décongélation. Après leur utilisation, les kits/les composants doivent être rapidement remis à -20 °C.

Matériels, réactifs et instruments non fournis

PCR

1. Eau stérile
2. Pipettes électroniques ou mécaniques avec embouts anti-aérosols
3. Thermocycleur avec couvercle chauffant

Ces kits ont été validés sur les thermocycleurs suivants :

MJ Research PTC 225 DNA Engine DYAD™, Applied Biosystems™ par Life Technologies™, Veriti™ Thermal cycler, Gene Amp® PCR System 9700 et Eppendorf Mastercycler® Pro

L'utilisation d'autres thermocycleurs requiert une validation par l'utilisateur.

4. Tubes de 0,2 mL pour les réactions de thermocyclage (Barrettes de 8 puits ou plaques de 96 puits)
Utiliser de préférence ceux recommandés par votre fournisseur de thermocycleur.
5. Tubes stériles de 1,5 ml
6. Espace de travail stérile (sorbonne ou hotte)
7. Centrifugeuse de paillasse avec adaptateurs de plaques capable d'atteindre une force centrifuge de 2 500 x g
8. Vortex

Électrophorèse sur gel d'agarose

9. Équipement pour l'électrophorèse sur gel d'agarose
10. Gel d'agarose (pour biologie moléculaire) à un 1 % dans du TBE contenant 0,1 µg/mL de bromure d'éthidium.
11. Tampon de charge
12. Marqueur de taille pour PCR couvrant 300 à 1 300 bp
13. Transilluminateur UV

Purification du produit de PCR

14. ExoSAP (USB® ExoSAP-IT® N° de catalogue 78200 pour 100 réactions or Illustra™ ExoProStar™ N° de catalogue US77702 pour 100 réactions)
15. MgCl₂ à 2 mM (disponible à l'achat auprès de CareDx Pty Ltd, référence MgCl2-1.0(50) ou MgCl2-1.0(3000))
16. Agitateur

L'utilisation d'autres méthodes de purification de la PCR doit être validée avant son application en routine.

Réaction de séquençage

17. Kit de séquençage cyclique BigDye® Terminator v3.1 ou v1.1, Applied Biosystems™ par Life Technologies™
18. Tampon de réaction de séquençage 5X (CareDx Pty Ltd, référence SEQ BUF-2.0(400) ou SEQ-BUF-2.0(5000)) ou tampon de séquençage 5X BigDye® Terminator v3.1 ou v1.1, Applied Biosystems™ par Life Technologies™

Purification des produits de réaction de séquençage

19. EDTA à 125 mM, pH 8,0 (disponible auprès de CareDx Pty Ltd, référence EDTA-3.0(200) ou EDTA-3.0(5000))
20. Éthanol absolu et dilué à 80 % Chaque run requiert une solution fraîchement préparée à 80 %, composé d'éthanol absolu et d'eau stérile. NE PAS UTILISER D'ÉTHANOL DÉNATURÉ (également connu dans certains pays sous le nom d'alcool à brûler).

L'utilisation d'autres méthodes de purification des produits de séquençage doit être validée avant son application en routine.

Dénaturation et électrophorèse des produits de réactions de séquençage

21. Formamide Hi-Di™, Applied Biosystems™ par Life Technologies™, référence 4311320
22. Séquenceur d'ADN automatisé et accessoires (par exemple ABI Prism® 3730 d'Applied Biosystems™ par Life Technologies™), incluant les logiciels de collecte de données et d'analyse.

Ces kits ont été testés et validés sur les plateformes et logiciels Applied Biosystems™ by Life Technologies™ suivantes : séquenceurs capillaires 3100, 3730 et 3730xl.

L'utilisation d'autres méthodes de dénaturation et plateformes de séquençage doit être validée avant son application en routine.

23. Logiciel d'analyse de séquence HLA (par exemple, ASSIGN™ SBT, version 4.7 ou version ultérieure, CareDx Pty Ltd).

Exigences applicables aux échantillons

1. Eau stérile (contrôle négatif/sans modèle)
2. ADN génomique humain de haut poids moléculaire (concentration de 20-100 ng/μl dans un tampon Tris/EDTA avec ratio $DO_{260/280} > 1,8$) extrait à partir d'échantillons de sang total prélevés sur anticoagulants ACD ou EDTA. Ne PAS utiliser d'échantillons prélevés contenant de l'héparine.

La méthode d'isolation de l'ADN utilisée doit être validée par l'utilisateur avant son application en routine.



Mises en garde et mesures de sécurité

- Ce kit doit être utilisé par du personnel de laboratoire formé et autorisé.
- Tous les échantillons, équipements et réactifs doivent être manipulés en accord avec les règles de bonnes pratiques de laboratoire. En particulier, tous les échantillons de patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Le port de gants et de blouses de laboratoire est fortement recommandé. Manipuler et éliminer tous les échantillons en accord avec les directives réglementaires locales et nationales.
- AUCUN des composants des kits ne contient de substances dangereuses.
- NE PAS utiliser les réactifs au-delà de leur date d'expiration.
- L'utilisation combinée de composants provenant de lots différents N'EST PAS recommandée. Une telle pratique peut affecter le bon fonctionnement des tests.
- L'utilisation de réactifs non inclus dans les kits (par ex., une autre *Taq* d'ADN polymérase) ou non listés dans le chapitre « Matériel requis mais non fourni » n'est PAS recommandée dans la mesure où cela pourrait affecter le bon fonctionnement des tests.
- Les précautions nécessaires doivent être prises afin d'éviter toute contamination inter-échantillons d'ADN. Changer d'embout de pipette entre chaque échantillon d'ADN.
- Les activités pré et post-PCR doivent être physiquement séparées. Utiliser des équipements, réactifs et blouses dédiés.
- Le bromure d'éthidium est potentiellement cancérigène. Le port de gants de protection est indispensable lors de la préparation et de la manipulation des gels. Jeter les gels et solutions contenant du bromure d'éthidium en accord avec les directives réglementaires locales et nationales.
- Lors de la lecture et capture des gels sous lumière UV, toujours éviter une exposition directe en utilisant un équipement de protection du visage approprié, des gants et une blouse de laboratoire.

Symboles

Les symboles non standard suivants ont été utilisés :

Symbole	Description
	Mix PCR locus spécifique
	ADN polymérase
	Amorce de séquençage HLA-A exon 1 - sens (en avant). Se référer à la composition des kits et au tableau 4 pour les autres amorces de séquençage.
	Date de fabrication (obligatoire pour les marchés autres que l'UE)

Procédure

1. PCR

- 1.1. Une réaction PCR doit être organisée pour chaque locus à amplifier et pour chaque échantillon individuel à tester. Chaque série d'amplification pour un locus donné doit comporter un contrôle positif approprié de génotype connu ainsi qu'un contrôle négatif.
- 1.2. Préparer la solution de Master-Mix PCR extemporanément pour chaque PCR. Décongeler rapidement le mix PCR locus-spécifique à température ambiante, puis homogénéiser à l'aide du vortex.
- 1.3. Répartir les volumes appropriés de Mix PCR et d'ADN polymérase dans un tube stérile en fonction du nombre d'échantillons à tester et en se référant au tableau 1 ci-dessous. Homogénéiser la solution sur vortex (3 à 4 impulsions).

Locus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Mix PCR spécifique au locus	16 µL	16 µL	16 µL	16,7 µL	16,7 µL	16,7 µL
exemple	MIX HLA-A					
ADN polymérase	1 µL	1 µL	1 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL
exemple	ADN POL – HLA-A					

Tableau 1 : composition du master mix requis par échantillon

- 1.4. Répartir 17 µL de master mix dans chaque puits de réaction.
- 1.5. Ajouter 3 µL d'ADN échantillon ou ADN contrôle dans chaque puits. Ajouter 3 µL of d'eau stérile pour le contrôle négatif.
- 1.6. Sceller les puits de réaction. Homogénéiser sur vortex et centrifuger brièvement.
- 1.7. Placer les puits de réaction dans le thermocycleur et exécuter conformément aux conditions de thermocyclage suivantes :

95 °C – 10 min.	} 33 cycles
96 °C – 20 s	
60 °C – 30 s	
72 °C – 3 min	
15 °C – à l'infini	

- 1.8. Il faut compter environ 2,5 heures pour terminer l'amplification.
- 1.9. Une fois la PCR terminée, retirer les puits de réaction du thermocycleur, puis procéder directement à l'étape d'électrophorèse sur gel d'agarose ou stocker à 4 °C.

REMARQUE : la purification des amplicons par traitement à l'ExoSAP doit avoir lieu dans les 24h qui suivent la fin de la réaction de PCR.

2. Électrophorèse sur gel d'agarose

- 2.1. Confirmer la réussite de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. Déposer 2 µL du produit de PCR mélangé à 5 µL de tampon de charge (loading buffer).

(L'utilisation d'autres volumes de tampon de charge est à valider par l'utilisateur.)
L'utilisation d'un gel d'agarose à 1 % est recommandée.

2.2. Le nombre et la taille attendue des amplicons varient en fonction du locus et du génotype échantillon. La taille attendue des amplicons PCR figure dans le tableau 2.

Locus	Taille de bande attendue
HLA-A	≈ 2 kbp
HLA-B	≈ 2 kbp
HLA-C	≈ 1,1 kbp et 1,4 kbp
HLA-DRB1	≈ 450 bp – 850 bp (HH-PD5.2-5) ≈ 630 bp – 980 bp (LG-PD5.2-7) La taille des bandes varie selon les groupes d'allèles spécifiques présents.
HLA-DQB1	≈ 300 bp et 500 bp (PQ-PD6.2-2) ≈ 400 bp et 500 bp (AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	≈ 400 bp (HH-PD10.1) ≈ 400 bp, ≈ 780 bp et ≈ 1 470 bp (KD-PD10.2-1)

Tableau 2 : tailles des produits prévues pour chaque test

3. Purification du produit de PCR

REMARQUE : L'utilisation de méthodes autres que celle utilisant l'ExoSAP-IT® ou ExoProStar™ (par ex. Agencourt®, AMPure® XP ou systèmes sur colonnes) est possible pour purifier ces produits PCR. Dans ce cas, il est fortement recommandé de la valider avant son utilisation en routine. Si le traitement ExoSAP est utilisé, il est recommandé de suivre la procédure décrite ici.

3.1. Préparer un Master-Mix avec 4 µL d'ExoSAP-IT® ou ExoProStar™ et 8 µL de 2 mM MgCl₂ par échantillon à purifier. Homogénéiser doucement au vortex. Déposer 12 µL de Master-Mix dans le puits de réaction de chaque échantillon. Fermer les puits, vortexer, puis placer sur un mélangeur ou vortexer doucement pendant 2 minutes. Centrifuger brièvement avant de placer dans le thermocycleur. Exécuter le thermocycleur selon le profil suivant :

37 °C – 30 min
80 °C – 15 min
4 °C – à l'infini

3.2. Après incubation, diluer le produit purifié à 1/4 avec de l'eau stérile. Cette étape de dilution permet l'obtention d'une quantité suffisante de matrice pour les éréactions de séquençage et garantit que la concentration de la matrice est suffisante pour produire des données de séquence de bonne qualité.

REMARQUE : Un facteur de dilution plus élevé (par ex. 1/8) peut être envisagé si des signaux trop intenses associés à un bruit de fond important et des artefacts sont constamment observés au niveau des séquences. Si en revanche les signaux de PCR sont faibles, il est conseillé de réduire le facteur de dilution.

3.3. Les produits traités à l'ExoSAP doivent être conservés à 4 °C jusqu'à ce qu'ils soient prêts à être utilisés. Ces échantillons peuvent être conservés 4 °C si leur utilisation a lieu dans la semaine. Pour une durée plus importante, il est conseillé de les stocker à -20 °C⁹.

4. Réaction de séquençage

REMARQUE : Dans le cas où des ambiguïtés hétérozygotes doivent être résolues à l'aide d'amorces de séquençage hémizygote telles que les HARPS[®], merci de vous reporter à la notice « OLERUP SBT™ HARPS[®] Instructions d'utilisation ».

4.1. Le Tableau 3 reprend les amorces de séquençage à utiliser pour chaque 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 [†]		HLA-DQB1		HLA-DPB1	
DRB1EX2F	DRB1EX2R-2	DQB1EX2F	DQB1EX2R	DPB1EX2F	DPB1EX2R
DRB1EX3R-2 [^]	RB-TG344-R [†]	DQB1EX3F	DQB1EX3R		

ou

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

Tableau 3 : amorce de séquençage fournie pour chaque locus

[†]RB-TG344-R est un HARP[®] dirigé contre le dimorphisme du codon 86. Son utilisation est facultative.

^{*}PB-AG341-R est un HARP[®] dirigé contre le dimorphisme du codon 85 dans le DPB1. Son utilisation est également facultative.

[^]Le DRB1EX3R-2 est une amorce de séquençage du DRB1 des kits HH-PD5.2-5 qui se comporte comme un HARP et est destiné à séquencer les groupes d'allèles suivants : *03, *08, *11, *12, *13, *14, *15 et *16. Cette amorce produira soit des hétérozygotes soit des hémizygotes ou encore aucune donnée de séquençage en fonction du génotype de l'échantillon devant être typé.

Lors de l'analyse des données DRB1EX3R-2 dans Assign™ par rapport à la référence DRB1-FullX2, les données résultant de l'exon 3 seront analysées dans une couche séparée. Elles permettront la résolution d'un certain nombre d'ambiguïtés alléliques dans l'exon 3, telles que l'ambiguïté DRB1*14:01 vs *14:54. Son utilisation est facultative en fonction de la stratégie de typage utilisée par le laboratoire. Ceci n'est pas applicable aux kits LG-PD5.2-7 étant donné qu'un séquençage bidirectionnel de l'exon 3 est disponible.

4.2. Préparer une solution fraîche de mix d'amorce de séquençage sur de la glace chaque fois qu'une réaction de séquence doit être réalisée. La composition et les volumes pour le mix indiqué ci-dessous s'entendent **par échantillon**.

Composant	Volume
Amorce de séquençage	2 µL
Eau stérile	11,5 µL
BigDye® Terminators	1 µL
Tampon de réaction de séquence 5x Seq Rxn	3,5 µL

4.3. Mélanger doucement chaque mélange de réaction de séquence à l'aide d'un vortex à pulsation.

4.4. Répartir 18 µL de chacun des mix de réaction de séquence dans le puits de réaction adéquat.

REMARQUE : Pour les séries impliquant peu d'échantillons et un nombre important d'amorces de séquençage, il est possible de distribuer l'amorce de séquençage (2 µl) directement au fond des puits réactionnels. Un master mix composé d'eau stérile, de BigDye® Terminators et du tampon de réaction de séquence 5x Seq Rxn peut ensuite être créé. 16 µl de ce master mix est distribué dans chaque puits réactionnel. Il est fortement recommandé que l'utilisateur procède à la validation de cette technique avant sa mise en place en routine.

4.5. Ajouter 2 µl de produit de PCR purifié à chaque puits de réaction indiqué.

REMARQUE : Les précautions nécessaires doivent être prises afin d'éviter toute contamination croisée des réactions de séquençage.

4.6. Fermer les puits de réaction, mélanger en douceur et centrifuger brièvement pour collecter le contenu au fond des puits.

4.7. Placer les puits de réaction dans un thermocycleur et lancer le programme suivant :

Nombre de cycles	Température et durée
25	96 °C – 10 s. 50 °C – 5 s. 60 °C – 2 min
1	4 °C – à l'infini

4.8. Une fois le programme terminé, retirer les puits de réaction/la plaque du thermocycleur, puis procéder directement à l'étape de purification des puits de réaction ou les conserver dans l'obscurité à 4 °C jusqu'à ce que vous en ayez besoin. Il est recommandé de procéder aux étapes de purification et d'analyse des séquences d'ADN dans les 24h.

5. Purification des produits de réaction de séquençage

REMARQUE : La purification des produits de réaction peut être réalisée par d'autres méthodes que celle de précipitation à l'éthanol indiquée ci-dessous. Dans ce cas, il est fortement recommandé de la valider avant son utilisation en routine.

- 5.1. Avant utilisation, centrifuger brièvement les puits/plaques. Si les capuchons utilisés pour le thermocyclage doivent être réutilisés, penser à les identifier pour éviter toute contamination croisée.
- 5.2. Retirer les joints avec précaution.
- 5.3. Ajouter 5 µl d'EDTA 125 mM, pH 8,0 à chaque puits de réaction. S'assurer que l'EDTA est bien au fond du puits.
- 5.4. Ajouter 60 µl d'éthanol 100 % à chaque puits de réaction. Sceller la plaque ou les puits et vortexer brièvement, mais soigneusement afin d'assurer un mélange homogène.
- 5.5. Centrifuger à 2 000g pendant 45 minutes pour récupérer le culot des produits de séquençage. **PROCÉDER IMMÉDIATEMENT À L'ÉTAPE SUIVANTE.** Si c'est impossible, centrifuger à nouveau 10 min supplémentaires.
- 5.6. Retirer les capuchons/film des puits réactionnels et retirer le surnageant en inversant la plaque sur du papier absorbant.
- 5.7. Placer la plaque inversée sur le papier dans la centrifugeuse et centrifuger 1 min à 350 g pour retirer le surnageant résiduel.
- 5.8. Retirer les puits de réaction de la centrifugeuse et les positionner en position redressée sur le banc de travail. Mettre le papier absorbant au rebut.
- 5.9. Préparer extemporanément une solution d'éthanol à 80 % avec de l'éthanol absolu et de l'eau stérile.
- 5.10. Ajouter 60 µl d'éthanol 80 % à chaque puits. Sceller les puits et vortexer brièvement.
- 5.11. Centrifuger à 2 000 g pendant 5 min
- 5.12. Répéter les étapes 5.6 et 5.7.
- 5.13. Retirer la plaque de la centrifugeuse et retirer le papier absorbant. Reboucher les puits et procéder à l'étape de dénaturation. Sinon, stocker à -20 °C et à l'obscurité¹⁰. Il est recommandé de procéder à l'analyse des produits d'extension sur le séquenceur d'ADN dans les 24h suivant leur obtention.

6. Dénaturation et électrophorèse des réactions de séquençage

REMARQUE : La procédure de dénaturation des produits de séquençage en Formamide Hi-Di™ décrite ici peut ne pas être nécessaire si une autre procédure de purification que celle à l'éthanol est utilisée. Il est fortement recommandé de valider l'utilisation de méthodes alternatives.

- 6.1. Ajouter 12 µl de Formamide Hi-Di™ à chaque puits. Vortexer et centrifuger brièvement.

6.2. Incuber les puits à 98 °C pendant 5 minutes. À la fin de l'incubation, garantir le refroidissement rapide jusqu'à température ambiante des puits de réaction (par exemple, poser sur la glace ou utiliser le thermocycleur pour la dénaturation et le refroidissement) avant de les mettre dans le séquenceur. Une fois que l'échantillon a été à nouveau placé en suspension dans Hi-Di Formamide, il est recommandé de le charger immédiatement sur l'appareil. L'échantillon sera stable pendant 24 heures sur l'appareil⁸.

REMARQUE : S'assurer de l'absence de bulles dans les puits. Celles-ci sont susceptibles d'entrer dans les capillaires et les endommager.

6.3. Placer la plaque dans le séquenceur automatisé et programmer le fichier de collecte de données en accord avec les spécifications du fournisseur.

6.4. Les paramètres instruments suivants ont été validés par le fournisseur en utilisant le kit de séquençage Big Dye[®] Terminator v3.1 et POP-7[™]. L'utilisation de ces paramètres avec d'autres polymères, chimies ou instruments nécessite une validation par l'utilisateur. Se référer au manuel de l'instrument pour plus d'instructions et de conseils. (ex. s'assurer que le paramètre « Dye set » sélectionné est adapté à la chimie utilisée, par exemple, la chimie BigDye[®] Terminator v1.1 requiert un « Dye set » différent de celui présenté ici).

Paramètre	Valeur
Dye set (Teinture)	Z_BigDyeV3
Mobility file	KB_3730_POP7_BDTV3
Basecaller	KB.bcp
Run Module	Regular FastSeq50_POP7
Injection time (Durée d'injection)	15 s
Run time (Durée d'exécution)	3 000 s

6.5. Utiliser le logiciel de collecte de données de l'instrument pour traiter les données brutes recueillies et créer des fichiers de séquençage. Se référer au manuel de l'instrument pour les instructions détaillées.

7. Modification et analyse des électrophorogrammes

Les kits OLERUP SBT[™] ont été conçus, développés et validés à l'aide du logiciel OLERUP ASSIGN[™] SBT développé par CareDx Pty Ltd. Les utilisateurs sont encouragés à utiliser ASSIGN[™] SBT Version 3.6 et ultérieures (ASSIGN[™] SBT V4.7 ou OLERUP ASSIGN[™] SBT V471), car celles-ci utilisent des fichiers de configuration et de référence conçus spécialement pour les kits de typage OLERUP SBT[™] et les HARPS[®]. Pour obtenir de plus amples informations sur l'utilisation de ce logiciel, consulter le manuel d'utilisation correspond qui peut être téléchargé depuis le site Internet de CareDx (<http://www.CareDx.com>).

Le séquençage basé sur des données de typage générées par les kits de typage OLERUP SBT[™] doit être analysé par rapport aux fichiers de référence ASSIGN[™] SBT suivants qui sont fournis par CareDx Pty Ltd :

Essai	Codes du produit	Fichier de référence Assign
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 ou 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

Caractéristiques de performance

Précision

Des panels de jusqu'à 93 échantillons issus du UCLA International DNA Exchange proficiency testing program (programme d'échange international d'ADN et de test de compétence de l'UCLA) (2008 – 2010) ont été testés avec les kits OLERUP SBT™ et ont produit les résultats suivants :

Locus	Nombre d'échantillons testés	Sensibilité diagnostique (% de PCR réussies)	Spécificité diagnostique (% de génotypes obtenus)	Nombre d'échantillons incorrectement typés	Nombre d'échantillons hétérozygotes	Nombre d'allèles uniques
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

*Les deux échantillons incorrectement typés contenaient de l'information concernant une séquence supplémentaire en dehors de l'exon 2 qui n'avait pas été rapportée par le UCLA International DNA Exchange proficiency testing program (programme d'échange international d'ADN et de test de compétence de l'UCLA). Un échantillon contenait 131:01, mais avait été protocolé comme 13:01 par le UCLA International DNA Exchange proficiency testing program. Les allèles diffèrent dans les exons 3 et 4. Les autres échantillons contenaient 107:01, mais ont été protocolés comme 13:01 par le UCLA International DNA Exchange proficiency testing program.

Pour les kits OLERUP SBT™ HLA-DRB1 (code du produit LG-PD5.2-7), un panel de 23 échantillons bien caractérisés couvrant une large fourchette d'allèles a été utilisé dans un test interne. De plus, un panel de 293 échantillons de source externe a également été typé sans connaissance *a priori* des données du typage HLA. Ces échantillons ont également été testés par l'essai OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2). Dans les cas où un résultat homozygote a été obtenu, les associations DQB1/ DRB1 pour ces échantillons ont été examinées pour confirmer le résultat ainsi que pour détecter les cas de la non-amplification de l'un des deux allèles (drop out).

L'analyse a donné les résultats suivants :

Locus	Nombre d'échantillon	Sensibilité diagnostique	Spécificité diagnostique	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons	Nombre d'allèles
-------	----------------------	--------------------------	--------------------------	-----------------------	-----------------------	------------------

	ons testés			incorrectement typés	hétérozygotes	uniques
HLA-DRB1	23	100 %	100 %	0	23	12
	286*	97,9 %	99,6 %	0	253	33

*L'amplification de six échantillons a échoué à cause de la mauvaise qualité des échantillons d'ADN. Un échantillon contenait de l'ADN contaminant dont la source se trouvait dans le laboratoire qui avait fourni les échantillons. La contamination a empêché d'obtenir le génotype de cet échantillon.

L'analyse des séquences des sites d'hybridation des amorces de PCR et de séquençage et les études d'évaluation de la performance ont démontré qu'aucun allèle courant et bien documenté n'a pas été amplifié en suivant les recommandations d'utilisation de ces kits. Pour plus d'informations, se référer au document *OLERUP SBT™ Primer Analysis* avec chacune des références des versions d'OLERUP ASSIGN™ SBT, téléchargeable sur le site de CareDx (<http://www.CareDx.com>).

Limite de détection

La concentration recommandée d'ADN génomique humain de haut poids moléculaire est de 20 à 100 ng/µL. Des études menées ont démontré que des échantillons à des concentrations de 5 ng/µL pouvaient être utilisés. Des génotypes corrects ont également été obtenus sur de l'ADN de qualité médiocre ou fragmenté.

Spécificité

Les kits OLERUP SBT™ de CareDx Pty Ltd sont des tests spécifiques à un locus. L'utilisation de ces kits en accord avec les instructions doit aboutir à l'amplification d'un seul locus. Dans la majeure partie des cas, l'utilisation des amorces de séquençage fournies permettra d'obtenir un typage HLA non ambigu. Dans les cas où des ambiguïtés hétérozygotes sont observées, l'utilisation d'amorces de résolution d'ambiguïtés (telles que OLERUP SBT™ HARPS®).

Il est à signaler que des mutations au niveau des zones d'amplification ou de séquençage sont possibles et pourraient provoquer des exclusions d'allèle (drop-out). Les échantillons présentant un typage homozygote doivent être confirmés par une autre technique.

Substances interférentes

CareDx Pty Ltd a identifié toutes les substances interférentes connues qui pourraient avoir un impact sur le test. Consulter le tableau ci-dessous.

Inhibiteur	Source potentielle	Risque	Commentaires
EDTA	Tampon TE, tube de collecte d'échantillon sanguin	Très faible	Suspendre à nouveau l'ADN dans Tris-HCl pH8 ou TE avec <1 mM EDTA. Utiliser des kits de préparation d'ADN sanguin commercialisés et/ou éviter les tubes de collecte d'échantillon sanguin EDTA
Alcools	Éthanol, isopropanol, alcool isoamylique	Faible	Veiller à sécher la pelote d'ADN à l'air et rechercher à l'œil la présence éventuelle de gouttelettes d'éthanol (1 % éthanol = 1,25 µl d'éthanol à 80 % dans un réaction PCR de 100 µl).
Excès de sel	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Très	Veiller à nettoyer soigneusement les pelotes d'ADN à

Inhibiteur	Source potentielle	Risque	Commentaires
		faible	l'éthanol à 80 %. Garantir un rapport de DO 230/260 au départ pour l'ADN génomique ~2
Sels chaotropiques	chlorure de guanidium ; MgCl ₂ ; urée	Très faible	Veiller à nettoyer soigneusement les pelotes d'ADN à l'éthanol à 80 %. Garantir un rapport de DO 230/260 au départ pour l'ADN génomique ~2
Phénol : chloroforme	Transfert organique	Très faible	Un composant de la procédure d'extraction d'ADN Trizol largement utilisée Veiller à nettoyer soigneusement les pelotes d'ADN à l'éthanol à 80 %. Garantir un rapport de DO 230/260 au départ pour l'ADN génomique ~2
Protéines	BSA, PEG, albumine sanguine	Très faible	Utiliser des kits commerciaux de préparation d'ADN sanguin. Garantir un rapport de DO 260/280 au départ pour l'ADN génomique >1,8
Hème, hémoglobine, immunoglobuline	Sang	Très faible	Éviter d'utiliser des échantillons qui affichent une hémolyse grossière. Utiliser des kits commerciaux de préparation d'ADN sanguin. Garantir un rapport de DO 260/280 au départ pour l'ADN génomique >1,8
Détergents/DDT	Désoxycholate de sodium, sarkosyl, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, glucoside N-octyl	Très faible	Veiller à nettoyer soigneusement les pelotes d'ADN à l'éthanol à 80 %. Garantir un rapport de DO 230/260 au départ pour l'ADN génomique ~2
Protéases	Protéinase K, manipulation d'échantillon	Très faible	Utiliser des kits commerciaux de préparation d'ADN sanguin ou salivaire. Porter des gants en permanence
Nucléases	Manipulation des échantillons, enzymes de restriction, nucléase micrococciale	Très faible	Utiliser des kits commerciaux de préparation d'ADN sanguin. Porter des gants en permanence
ADN/ARN exogène	Transfert, contamination	Très faible	Préparer l'ADN génomique dans l'espace pré-PCR dédié
Transporteurs	ARN, héparine, glycogène	Très faible	Utiliser des kits de préparation d'ADN sanguin commercialisés et/ou éviter les tubes de collecte d'échantillon sanguin héparine
Excès d'ions métalliques	Mg ²⁺ de tampon PCR, ions Fe	Très faible	Veiller à nettoyer soigneusement les pelotes d'ADN à l'éthanol à 80 %. Garantir un rapport de DO 230/260 au départ pour l'ADN génomique ~2
Médicaments antiviraux (par exemple, acyclovir)	Sang	Très faible	Utiliser des kits commerciaux de préparation d'ADN sanguin. Garantir un rapport de DO 260/280 au départ pour l'ADN génomique >1,8
Talc de gants	Gants à talc	Très faible	Utiliser des gants sans talc
Tubes PCR exposés aux rayons UV	Traitement UV des tubes PCR	Très faible	Éviter le traitement UV du matériel en plastique

Limitations et précautions

- Il est recommandé de procéder à une validation technique de ces kits sur des échantillons dont le typage HLA est connu et a été déterminé par une autre technique de biologie moléculaire avant de procéder à leur mise en place en routine au sein du laboratoire. Toute modification de cette procédure (par exemple, utilisation d'autres méthodes de PCR ou purification de produits de séquences d'ADN) doit faire l'objet d'une validation par l'utilisateur avant la mise en œuvre.
- Ces kits de typage basés sur la séquence ont été validés sur des panels d'échantillons dont les génotypes présentent une forte diversité allélique. Néanmoins, il est à noter que des allèles rares ou des allèles présentant des polymorphismes dans les zones d'amplification et de séquençage peuvent être rencontrés ; il existe un risque que ceux-ci ne soient pas amplifiés ou séquencés.
- La nature même de la technique de typage basée sur la séquence HLA fait que d'autres facteurs que le mix PCR peuvent provoquer des amplifications préférentielles ou des « drop-out », en conséquence, les typages homozygotes doivent être considérés avec attention et si possible confirmés avec une technique alternative ou l'analyse des typages de la famille du patient.
- Chaque manipulation de PCR doit inclure un contrôle positif (ADN humain) et un contrôle négatif (eau stérile). Le contrôle positif doit produire un amplicon de PCR de taille attendue en fonction du locus amplifié et les séquences produites doivent être en accord avec le génotype attendu. Aucun amplicon de PCR ne doit être produit au niveau du contrôle négatif. Si un amplicon est présent, une contamination a pu avoir lieu au niveau d'une des étapes de la manipulation et le processus doit être répété.
- Des amplicons de PCR de faible intensité et de tailles différentes peuvent apparaître occasionnellement, ces amplicons n'interfèrent pas dans le processus de séquençage.

Licence

Les kits OLERUP SBT™ contiennent une polymérase "hot Start" GoTaq® (DNA POL) fabriquée par Promega Corporation pour distribution par CareDx Pty Ltd. Licences déposées sous les brevets U.S. Nos. 5,338,671 et 5,587,287 et leurs brevets étrangers correspondants.

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+ 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. Pour obtenir de plus amples informations sur le UCLA DNA Exchange Program (programme d'échange d'ADN de l'UCLA), consultez le site : <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm>.
7. Les allèles HLA courants sont disponibles à l'adresse <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.
8. Site de Thermo Fisher (<https://www.thermofisher.com/search/results?query=4311320&persona=DocSupport&type=Product+FAQs> , ID de réponse : E15311)
9. Current Protocols in Molecular Biology (2001)3, Unit 15.2.5
10. Site de 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 (voir aussi citations dans ce document)
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 (voir aussi citations dans ce document)
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.

Résolution de problème

Problème	Origine(s) possible(s)	Solution
Produit de PCR trop peu concentré	ADN de qualité médiocre	Vérifier la qualité de l'ADN par électrophorèse sur gel. Un ADN non dégradé doit présenter une bande d'environ 3 kb avec peu ou pas de smear visible sur le gel. Si possible, procéder à une réextraction de l'ADN et une nouvelle réaction de PCR.
	Quantité insuffisante d'ADN ajoutée à la PCR	Vérifier que la concentration d'ADN se situe entre 20 et 100 ng/µL. Si possible, procéder à une réextraction de l'ADN et une nouvelle réaction de PCR.
	Présence d'inhibiteurs de PCR dans l'ADN génomique utilisé	<p>Les inhibiteurs de PCR sont présents dans tous les fluides corporels, dont le sang, le sérum et le plasma. Les inhibiteurs de PCR désignent un groupe diversifié de substances aux propriétés et aux mécanismes d'action différents. Les inhibiteurs les plus fréquents dans le sang sont l'hémoglobine, les IgG et la lactoferrine. De plus, certaines hormones ou médicaments antiviraux comme l'acyclovir, ainsi que certains antibiotiques, peuvent également avoir un impact sur l'amplification des gènes^{12,13}. Éviter d'utiliser des échantillons de sang complets contenant de l'héparine. Pour les détails, consulter les manuscrits en référence^{12,13}. EDTA : peut altérer les concentrations de Mg²⁺ et peut inhiber l'ADN polymérase à certaines concentrations¹³. En général, les tubes avec citrate de sodium permettent d'obtenir un ADN de bonne qualité¹¹.</p> <p>Les méthodes d'extraction/de purification de l'ADN peuvent éliminer les inhibiteurs de PCR. Le client doit évaluer les méthodes d'extraction/de purification de l'ADN afin de garantir la pureté de l'échantillon.</p> <p>Si possible, procéder à une réextraction de l'ADN et une nouvelle réaction de PCR.</p>
	ADN polymérase non ajouté au mastermix ou mélange insuffisant du mastermix avant l'ajout aux échantillons	Réaliser à nouveau le PCR. S'assurer que les composants du mastermix sont ajoutés et suffisamment mélangés via vortex.
	Problèmes de thermocyclage	Vérifier les paramètres de run du thermocycleur. Vérifier l'historique des runs pour confirmer que le run n'a pas été arrêté de manière prématurée. S'assurer que le thermocycleur fonctionne conformément aux spécifications du fabricant et

		qu'il fait l'objet d'un entretien régulier.
	Pas de bromure d'éthidium ajouté au gel.	Plonger le gel dans un bain de coloration contenant 1X TBE avec 0,5 mg/mL de bromure d'éthidium. Décolorer dans 1X TBE avant de prendre l'image du gel S'assurer que le bromure d'éthidium a été ajouté au gel avant de verser.
	Les échantillons d'ADN élués ou dilués dans de l'eau peuvent avoir un pH légèrement acide.	Dans la mesure du possible, utiliser de l'eau stérile avec un pH neutre.
Pas ou faible produit de PCR pour la bande des exons 3-5 pour l'essai KD-PD10.2-1	ADN de qualité médiocre	L'amplification des échantillons de très mauvaise qualité peut donner une faible amplification de l'amplicon des exons 3-5. Le typage peut encore être réalisé en utilisant les données de séquence de l'exon 1 et 2. Sinon, recommencer l'extraction de l'ADN et la PCR quand c'est possible.
Taille de bande incorrecte	Mauvais kit utilisé	Vérifier que le kit approprié est utilisé.
	Programme de cycles thermiques utilisé incorrect	Vérifier les paramètres des cycles thermiques.
	Contamination du produit de PCR	Vérifier le contrôle négatif pour valider la présence de contamination. Décontaminer les zones de travail et répéter la PCR Répéter la PCR pour identifier la source de contamination. Utiliser éventuellement un nouveau kit. Si l'ADN génomique d'un échantillon apparaît comme contaminé, ré-extraire celui-ci pour avoir une autre source d'ADN.
Électrophérogrammes de faible intensité	Produit de PCR trop peu concentré	Vérifier l'image du gel. Il n'est PAS recommandé de séquencer des bandes de PCR de faible intensité dans la mesure où la qualité des séquences risque d'être insuffisante pour le SBT. Utiliser un facteur de dilution du produit de PCR plus faible (par ex. 1:2, 1:3) après la purification.
	Quantité insuffisante de produits de séquençage analysés sur le séquenceur	Vérifier les paramètres du séquenceur. La tension et le temps d'injection peuvent être augmentés.
	Problèmes liés à la purification des produits du séquençage	Procéder avec précaution aux étapes de retrait du surnageant pour éviter de perdre le culot de séquences.
L'intensité du signal est trop élevée (présence de pics fluorescents – artefacts)	Quantité de produit PCR trop importante	Vérifier l'image du gel. Utiliser un facteur de dilution plus important à la suite de la purification du produit de PCR. Vérifier la quantité de d'ADN polymérase utilisée pour la réaction de PCR.

	Quantité trop importante de produits de séquençage analysés sur le séquenceur	Vérifier les paramètres de l'instrument. La tension e et le temps d'injection peuvent être diminués.
Ligne de base trop élevée (bruit de fond important)	Produit de PCR contaminé	Se référer aux actions correctives proposées précédemment.
	Amplification de gènes HLA- associés	Vérifier les paramètres des cycles thermiques.
	Mauvaise purification de la PCR	S'assurer que le traitement ExoSAP est réalisé en accord avec les recommandations de la notice d'utilisation du kit. S'assurer que le mélange de PCR est correctement homogénéisé avec l'ExoSAP. Envisager d'utiliser l'ExoSAP suivant la procédure des fabricants (augmentation de la quantité d'enzyme) ou envisager une technique de purification alternative.
	Réactions de séquençage contaminées	Prendre toutes les précautions nécessaires pour éviter les contaminations croisées. Remplacer les cônes de pipette chaque fois que cela est possible. Ajouter les solutions au niveau de la partie supérieure des puits. Éviter les aérosols.
	Amorces de séquençage contaminées	Vérifier la qualité des séquences obtenues avec les autres amorces ainsi que la qualité des séquences obtenues avec la même amorce sur d'autres échantillons. Penser à utiliser un nouvel aliquot d'amorce de séquençage.
	Mix de Dye Terminators ou tampon de séquence contaminé	Répéter la réaction de séquençage avec un nouvel aliquot de réactifs.
	Mauvaise purification des produits de séquençage	Répéter la réaction de séquençage et vérifier que la purification est faite en suivant les instructions du fabricant.
Présence de « Dye blobs » (blocs de teinture)	Mauvaise purification des produits de séquençage	Purifier la réaction de séquençage en suivant les recommandations décrites dans la notice des kits. S'assurer que les produits sont suffisamment lavés à l'éthanol à 80 %.

Produits associés

DIV avec marquage CE :

ASSIGN™ SBT 3.6+ Code de produit : CGX0036+

ASSIGN™ SBT v4.7 Code de produit : CGX00470

OLERUP ASSIGN™ SBT v471 Code de produit : CGX00471

OLERUP SBT™ HARPS®

Pour obtenir la liste complète des produits, consultez la notice d'utilisation pour OLERUP SBT™ HARPS®

Produits pour la recherche uniquement :

Kits de typage HLA OLERUP SBT™

AN-PD11.0-0(20) Kit HLA-DRB3 OLERUP SBT™ (20 et 50 tests)
AN-PD11.0-0(50)

AN-PD12.0-0(20) Kit HLA-DRB4 OLERUP SBT™ (20 et 50 tests)
AN-PD12.0-0(50)

AN-PD13.0-0(20) Kit HLA-DRB5 OLERUP SBT™ (20 et 50 tests)
AN-PD13.0-0(50)

LC-PD2.9(20) Kit HLA-B57 OLERUP SBT™ (20 et 50 tests)
LC-PD2.9(50)

Remarque : les produits listés ci-dessus ont une licence de DIV en Australie.

Réactifs de laboratoire généraux

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

SEQ BUF – 2.0(400) Tampon de réaction de séquence 5x Seq Rxn
SEQ BUF – 2.0(5000)

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

Contactez votre distributeur local pour plus de détails



Kits auto-certifiés :

HH-PD3.2-2(20) Kit HLA-C OLERUP SBT™ (20 et 50 tests)

HH-PD3.2-2(50)

PQ-PD6.2-2(20) Kit HLA-DQB1 OLERUP SBT™ (20 et 50 tests)

PQ-PD6.2-2(50)

AN-PD6.2-3(20)

AN-PD6.2-3(50)

HH-PD10.1(20) Kit HLA-DPB1 OLERUP SBT™ (20 et 50 tests)

HH-PD10.1(50)

KD-PD10.2-1(20)

KD-PD10.2-1(50)

Coordonnées

Fabricant

CareDx Pty Ltd
PO Box 1294
Fremantle 6959
Australie-Occidentale
Australie
Tél : +61-08-9336-4212
Email : orders-aus@ caredx.com
Site Web : www.CareDx.com

Pour obtenir de l'aide ou passer une commande, consulter le site Internet de CareDx (<http://www.caredx.com>).