

## Kompleti za tipizaciju HLA

### Upute za upotrebu

PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) amplifikacija i sekvenciranje  
lokusa HLA razreda I i II

Broj inačice: 1.4

Datum izdavanja: 27. 05. 2020.

**IVD**



CareDx Pty  
20 Collie St.  
Fremantle 6160  
Zapadna Australija  
Australija



Qarad bvba  
Cipalstraat 3  
B-2440 Geel  
Belgija

# Sadržaj

<b>NAČELO RADA</b> .....	<b>3</b>
<b>NAMJENA</b> .....	<b>3</b>
<b>SASTAV KOMPLETA</b> .....	<b>4</b>
<b>UVJETI POHRANE</b> .....	<b>9</b>
<b>MATERIJALI, REAGENSI I OPREMA KOJI SE NE ISPORUČUJU</b> .....	<b>10</b>
<b>PREDUVJETI ZA UZORKE</b> .....	<b>11</b>
<b>UPOZORENJA I MJERE OPREZA</b> .....	<b>12</b>
<b>SIMBOLI</b> .....	<b>12</b>
<b>POSTUPAK</b> .....	<b>13</b>
1. PCR .....	13
2. ELEKTROFOREZA U AGARIZOM GELU.....	13
3. PROČIŠĆAVANJE PRODUKATA PCR-A.....	14
4. REAKCIJA SEKVENCIRANJA .....	15
5. PROČIŠĆAVANJE PRODUKATA SEKVENSIJSKE REAKCIJE .....	16
6. DENATURACIJA I ELEKTROFOREZA REAKCIJSKIH PRODUKATA SEKVENCIRANJA .....	17
7. UREĐIVANJE I ANALIZA ELEKTROFEROGRAMA .....	18
<b>RADNE KARAKTERISTIKE</b> .....	<b>20</b>
TOČNOST .....	20
GRANICA DETEKCIJA .....	21
SPECIFIČNOST .....	21
<b>INTERFERIRAJUĆE TVARI</b> .....	<b>21</b>
<b>OGRANIČENJA I MJERE OPREZA</b> .....	<b>22</b>
<b>LICENCA</b> .....	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFIJA</b> .....	<b>24</b>
<b>OTKLANJANJE POTEŠKOĆA</b> .....	<b>25</b>
<b>POVEZANI PROIZVODI</b> .....	<b>27</b>
<b>OLERUP SBT™ HARPS®</b> .....	<b>27</b>
<b>PODACI ZA KONTAKT</b> .....	<b>28</b>


## Načelo rada

Postupak tipizacije temeljene na sekvenciranju HLA (eng. Sequencing Based Typing – SBT) razvio je D. Sayer 2000.<sup>1</sup>, a poboljšan je 2004.<sup>2</sup> kao analitički test u jednoj epruveti. Postupak se sastoji od početne amplifikacije ciljane sekvencije nakon čega slijedi enzimski tretman radi uklanjanja neuklopljenih početnica i dNTP-a. Amplikon se tada koristi kao predložak za izravno automatizirano fluorescentno sekvenciranje DNK pomoću prilagođenih sekvencijskih početnica i kemikalija za sekvenciranje sustava Big Dye<sup>®</sup> Terminator koji razvija Applied Biosystems<sup>™</sup> tvrtke Life Technologies<sup>™</sup>. Produkti ekstenzije pročišćavaju se metodom taloženja etanolom i denaturiraju pomoću formamida Hi-Di<sup>™</sup> proizvođača Applied Biosystems<sup>™</sup> tvrtke Life Technologies<sup>™</sup>, a zatim odjeljuju i detektiraju na automatiziranom fluorescentnom DNK sekvenceru. Preporučuje se da se dobiveni podaci potom analiziraju pomoću softvera za analizu sekvenci ASSIGN<sup>™</sup> SBT tvrtke CareDx Pty Ltd<sup>3-5</sup>.


## Namjena


Kompleti CareDx Pty Ltd's OLERUP SBT<sup>™</sup> HLA SBT koriste se za tipizaciju gena HLA razreda I (HLA-A, -B, i -C) i razreda II (HLA-DRB1, -DQB1 i -DPB1) u laboratorijskim uvjetima iz genomske DNK. Svaki komplet sadrži reagense koji olakšavaju PCR amplifikaciju i sekvenciranje DNK određenog gena. Zatim se dobiveni podaci o sekvenciranju interpretiraju korištenjem analitičkog softvera ASSIGN<sup>™</sup> SBT tvrtke CareDx Pty Ltd. Treba napomenuti da se ovi SBT kompleti ne koriste za dijagnosticiranje bolesti, ali se mogu koristiti u sklopu postupka za određivanje kompatibilnosti između davatelja i primatelja. Analitički postupak sastoji se od sekvenciranja DNK pri čemu se izdvaja DNK sekvenca gena HLA (eng. Human Leukocyte Antigens). Predviđeni korisnici uređaja imaju odgovarajuće kvalificirano osoblje koje ima spoznaju o učestalosti tipova HLA u njihovoj populaciji. Ispitivanja se moraju izvesti u reguliranim laboratorijima.


## Sastav kompleta

Komplet	Kataloški br.		Sadržaj za PRE PCR-a <sup>†</sup> (Broj bočica)	Sadržaj za POST PCR (Broj bočica)	
<b>Razred I</b>					
HLA-A	XH-PD1.1-2(20)	20 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-A MIX</div>	1 x 25 $\mu$ L 1 x 352 $\mu$ L <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 $\mu$ L svaka
	XH-PD1.1-2(50)	50 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-A MIX</div>	1 x 60 $\mu$ L 1 x 880 $\mu$ L <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 $\mu$ L svaka
HLA-B	BS-PD2.1-2(20)	20 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-B MIX</div>	1 x 25 $\mu$ L 1 x 352 $\mu$ L <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 $\mu$ L svaka
	BS-PD2.1-2(50)	50 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-B MIX</div>	1 x 60 $\mu$ L 1 x 880 $\mu$ L <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 $\mu$ L svaka

Komplet	Katalogski br.	Σ	Sadržaj za PRE PCR-a <sup>+</sup> (Broj bočica)		Sadržaj za POST PCR (Broj bočica)		
HLA-C	HH-PD 3.2-2(20)	20 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-C</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-C MIX</div>	1 x 25µL 1 x 352µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX7F</div>	1 x 44µL svaka	
	HH-PD 3.2-2(50)	50 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-C</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-C MIX</div>	1 x 60µL 1 x 880µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX7F</div>	1 x 110µL svaka	

Komplet	Kataloški br.		Sadržaj za PRE PCR-a <sup>†</sup> (Broj bočica)	Sadržaj za POST PCR (Broj bočica)	
<b>Razred II</b>					
HLA-DRB1	HH-PD5.2-5(20)	20 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1 MIX</div>	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">RB-TG344-R</div>	1 x 44 $\mu$ L svaka
	HH-PD5.2-5(50)	50 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1 MIX</div>	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">RB-TG344-R</div>	1 x 110 $\mu$ L svaka
	LG-PD5.2-7(20)	20 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1 MIX</div>	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3F-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3R-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">RB-TG344-R</div>	1 x 44 $\mu$ L svaka
	LG-PD5.2-7(50)	50 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DRB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1 MIX</div>	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX2R-2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3F-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DRB1EX3R-7</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">RB-TG344-R</div>	1 x 110 $\mu$ L svaka
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2(20)	20 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DQB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DQB1 MIX</div>	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3R</div>	1 x 44 $\mu$ L svaka
	PQ-PD6.2-2(50)	50 testova	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DQB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DQB1 MIX</div>	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DQB1EX3R</div>	1 x 110 $\mu$ L svaka

Komplet	Kataloški br.		Sadržaj za PRE PCR-a <sup>†</sup> (Broj bočica)		Sadržaj za POST PCR (Broj bočica)		
	AN-PD6.2-3(20)	20 testova	<b>DNA POL – DQB1</b> <b>HLA-DQB1 MIX</b>	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L	<b>DQB1EX2F</b> <b>DQB1EX3F</b>	<b>DQB1EX2R-3</b> <b>DQB1EX3R</b>	1 x 44 $\mu$ L svaka
	AN-PD6.2-3(50)	50 testova	<b>DNA POL – DQB1</b> <b>HLA-DQB1 MIX</b>	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L	<b>DQB1EX2F</b> <b>DQB1EX3F</b>	<b>DQB1EX2R-3</b> <b>DQB1EX3R</b>	1 x 110 $\mu$ L svaka
HLA-DPB1	HH-PD10.1(20)	20 testova	<b>DNA POL – DPB1</b> <b>HLA-DPB1 MIX</b>	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L	<b>DPB1EX2F</b>	<b>DPB1EX2R</b>	1 x 44 $\mu$ L svaka
	HH-PD10.1(50)	50 testova	<b>DNA POL – DPB1</b> <b>HLA-DPB1 MIX</b>	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L	<b>DPB1EX2F</b>	<b>DPB1EX2R</b>	1 x 110 $\mu$ L svaka
	KD-PD10.2-1(20)	20 testova	<b>DNA POL – DPB1</b> <b>HLA-DPB1 MIX</b>	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L	<b>DPB1EX1F</b> <b>DPB1EX2F</b> <b>DPB1EX3F</b> <b>DPB1EX4F</b> <b>DPB1EX5F</b>	<b>DPB1EX1R</b> <b>DPB1EX2R</b> <b>DPB1EX3R</b> <b>DPB1EX4R</b> <b>DPB1EX5R</b>	1 x 44 $\mu$ L svaka

Komplet	Kataloški br.		Sadržaj za PRE PCR-a <sup>†</sup> (Broj bočica)		Sadržaj za POST PCR (Broj bočica)		
	KD-PD10.2-1(50)	50 testova	<b>DNA POL – DPB1</b> <b>HLA-DPB1 MIX</b>	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L	<b>DPB1EX1F</b> <b>DPB1EX2F</b> <b>DPB1EX3F</b> <b>DPB1EX4F</b> <b>DPB1EX5F</b> <b>PB-AG341-R</b>	<b>DPB1EX1R</b> <b>DPB1EX2R</b> <b>DPB1EX3R</b> <b>DPB1EX4R</b> <b>DPB1EX5R</b>	1 x 110 $\mu$ L svaka

<sup>†</sup>PRE-PCR komplet sadrži bočicu lokacijski specifične PCR smjese (npr. **HLA-A MIX**) koja se sastoji od PCR pufera, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> i lokacijski specifične početnice PCR-a, zajedno s jednom bočicom DNK polimeraze (npr. **DNA POL – HLA-**).

POST-PCR komplet sadrži sekvencijske početnice (npr. **AEX1F**).



## Uvjeti pohrane

PRE- i POST-PCR kutije mogu se odvojiti i pohraniti u zamrzivač označene kao PRE- i POST-PCR. Kada se čuvaju na -20°C (raspon temperature od -15°C do -25°C je prihvatljiv), kompleti se mogu koristiti sve do isteka roka označenog na vanjskim spremnicima i mogu podnijeti do 25 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja.

Ubrzano ispitivanje stabilnosti za komplete HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i -DPB1 dokazalo je rok trajanja od dvije i pol godine od datuma proizvodnje, pohranjenih na -20 °C. Provedeno je potvrdno testiranje u stvarnom vremenu. Ne upotrebljavati nakon isteka roka valjanosti.

Da biste održali optimalne performanse kompleta, komponente kompleta treba prije upotrebe izvaditi iz zamrzivača s -20°C i brzo odmrznuti na sobnu temperaturu. Komponente kompleta, s izuzetkom polimeraze, treba nakon toga lagano promiješati na vrtložnoj miješalici kako bi se osiguralo da se sastojci svake epruvete nakon odmrzavanja izmiješaju u dovoljnoj mjeri. Nakon upotrebe, komplete/komponente treba odmah vratiti na -20 °C.

## Materijali, reagensi i oprema koji se ne isporučuju

### PCR

1. Sterilna voda
2. Elektronske ili mehaničke pipete i vrhovi otporni na aerosole
3. Termocikler s grijanim poklopcem

Ovi kompleti su validirani pomoću sljedećih termociklera:

Termocikler PTC 225 DNK Engine DYAD™ tvrtke MJ Research, Applied Biosystems™ tvrtke Life Technologies™, termocikler Veriti™, Gene Amp® PCR System 9700 i Eppendorf Mastercycler® Pro.

**Upotreba drugih termociklera s ovim kompletima zahtijeva validaciju od strane korisnika.**

4. Tankoslojne reakcijske epruvete za termocikler od 0,2 ml (trake s 8 jažica ili ploča s 96 jažica).  
Upotrijebite epruvete koje su preporučene za vaš termocikler.
5. Sterilne epruvete od 1,5 ml
6. Sterilni radni prostor kao što su vitrina za biološku zaštitu ili digestor
7. Stolna centrifuga s pločastim adapterima i kapacitetom do 2500 x G
8. Vrtložna miješalica

### Elektroforeza u agarozom gelu

9. Uređaj za elektroforezu u agarozom gelu
10. 1 % agaroz (za molekularnu biologiju) TBE koji sadrže gel 0,12g/ml etidijev bromid.
11. Dodatni pufer
12. PCR marker prikladan za pokrivanje raspona od 300 - 1300 bp
13. UV transiluminator

### Pročišćavanje produkata PCR-a

14. ExoSAP (USB® ExoSAP-IT® kat br 78200 za 100 reakcija ili Illustra™ ExoProStar™ kat. br US77702 za 100 reakcija)
15. 2 mM MgCl<sub>2</sub> (nabava od proizvođača CareDx Pty Ltd, šifra proizvoda MgCl<sub>2</sub>-1.0 (50) ili MgCl<sub>2</sub>-1.0 (3000))
16. Vibracijski uređaj

**Korištenje alternativnih PCR tehnika pročišćavanja zahtijeva validaciju prije upotrebe od strane korisnika.**

### Reakcija sekvenciranja

17. Komplet za cikličko sekvenciranje BigDye® Terminator v3.1 ili v1.1, Applied Biosystems™ tvrtke Life Technologies™.

18. 5 x reakcijski pufer za sekvenciranje (CareDx Pty Ltd, šifra proizvoda SEQ BUF-2.0(400) ili SEQ BUF-2.0(5000)) ili BigDye® Terminator v3.1 ili pufer za sekvenciranje v1.1 5 X, Applied Biosystems™ tvrtke Life Technologies™.

### **Pročišćavanje produkata sekvencijske reakcije**

19. 125 mM EDTA, pH 8,0 (može se kupiti kod tvrtke CareDx Pty Ltd, šifra proizvoda EDTA-3.0(200) ili EDTA-3.0(5000)).
20. Apsolutni i 80 %-tni etanol. Za svaki postupak potreban je svježe pripremljeni 80 %-tni etanol koji se sastoji od apsolutnog etanola i sterilne vode. **NE KORISTITE DENATURIRANI ETANOL** (također poznat kao metilirani alkohol u nekim zemljama).

**Korisnik treba prije upotrebe alternativnih tehnika pročišćavanja sekvenciranja provesti validaciju.**

### **Denaturacija i elektroforeza produkata sekvencijske reakcije**

21. Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems™ tvrtke Life Technologies™, šifra proizvoda 4311320
22. Automatizirani sekvencer DNK i pribor (npr. Applied Biosystems™ tvrtke Life Technologies™ ABI Prism® 3730), uključujući prikupljanje podataka i softver.

Navedeni kompleti su ispitani i validirani s proizvodima Applied Biosystems™ tvrtke Life Technologies™ 3100, 3730 i 3730xl kapilarnim sekvencerom i softverom.

**Druge tehnike denaturacije i sekvencijske platforme korisnik treba validirati prije upotrebe.**

23. Softver za analizu sekvence HLA (npr. ASSIGN™ SBT, verzija 4.7 ili novija, CareDx Pty Ltd).

### **Preduvjeti za uzorke**

1. Sterilna voda (negativno / bez kontrole šablona)
2. Humana genomska DNK visoke molekulske mase (raspon koncentracije 20-100ng/μL u Tris/EDTA puferu i  $OD_{260/280} > 1,8$ ) ekstrahirana iz antikoaguliranih uzoraka pune krvi ACD ili EDTA. **NE koristite uzorke pune krvi koji sadrže heparin.**

**Korisnik treba validirati metodu izolacije DNK prije primjene.**


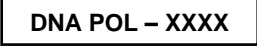




## Upozorenja i mjere opreza

- Ovaj komplet mora koristiti obučeno i ovlašteno laboratorijsko osoblje.
- Sa svim uzorcima, opremom i reagensima mora se rukovati u skladu s dobrom laboratorijskom praksom. Posebno se sav materijal pacijenta mora smatrati potencijalno zaraznim. Preporučuje se upotreba rukavica i laboratorijskih mantila. Postupajte s uzorcima i zbrinjavajte ih u skladu s lokalnim i državnim regulatornim smjernicama.
- Komponente kompleta NE sadrže opasne tvari.
- NE upotrebljavajte reagense nakon isteka roka.
- Upotreba komponenti kompleta iz različitih skupina kompleta NIJE preporučljiva. Takva upotreba može utjecati na uspješnost ispitivanja.
- Upotreba reagensa koji nisu uključeni u ovaj komplet ili nisu navedeni u cjelini "Materijali, reagensi i oprema koja se ne isporučuje" (npr. alternativa *Taq* DNK polimeraze) NE preporučuje se. Takva upotreba može utjecati na performanse ispitivanja.
- Treba biti oprezan kako bi se spriječila unakrsna kontaminacija DNK uzoraka. Promijenite vrhove između DNK uzoraka.
- Pred- i post- PCR aktivnosti moraju biti strogo razdvojene. Koristite posebno namijenjenu opremu, reagense i laboratorijske presvlake.
- Etidijev bromid potencijalni je karcinogen. Zaštitne rukavice uvijek se moraju koristiti prilikom pripreme i rukovanja gelovima. Zbrinite etidij-bromidne gelove i pufere u skladu s lokalnim i državnim smjernicama.
- Tijekom pregledavanja i fotografiranja agaroznih gelova pod UV svjetlošću, obavezno izbjegavajte kontakt i koristite odgovarajuću zaštitu lica, UV rukavice i jednokratne laboratorijske presvlake.

## Simboli

Korišteni su sljedeći nestandardni simboli:

Simbol	Opis
	PCR smjesa specifična za lokus
	DNK polimeraza
	HLA-A egzon jedna početnica za sekvenciranje prema naprijed. Pogledajte "Sastav kompleta" i Tablicu 4 za ostale sekvencijske početnice.
	Datum proizvodnje (potrebno za tržišta izvan EU).

## Postupak

### 1. PCR

- 1.1. Trebat će se uspostaviti zasebna PCR reakcija za svaki amplificirani lokus i za svaki pojedinačni uzorak koji će se testirati. Svaki test treba imati odgovarajuće pozitivne kontrole poznatog genotipa i najmanje jednu negativnu kontrolu za svaki amplificirani lokus.
- 1.2. Pripremite svježu otopinu glavne PCR smjese svaki put kada provodite PCR. Brzo otopite lokacijski specifične PCR smjese na sobnoj temperaturi. Kada se odmrznu, nakratko ih vrtložno promiješajte.
- 1.3. Raspodijelite potrebne volumene PCR smjese i DNK polimeraze u sterilnu epruvetu prema broju uzoraka koji se testiraju (pogledajte Tablicu 1 ispod za volumen po reakciji). Promiješajte otopinu vrtloženjem 3-4 puta.

Lokus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
PCR smjesa specifična za lokus	16 $\mu$ L	16 $\mu$ L	16 $\mu$ L	16,7 $\mu$ L	16,7 $\mu$ L	16,7 $\mu$ L
npr. <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">HLA-A MIX</span>						
DNK polimeraza	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0,3 $\mu$ L	0,3 $\mu$ L	0,3 $\mu$ L
npr. <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">DNA POL – HLA-A</span>						

Tablica 1: Za svaki uzorak potrebna je glavna smjesa.

- 1.4. Razdijelite 17 $\mu$ L glavne smjese u sve reakcijske jažice.
- 1.5. Dodajte 3 $\mu$ L uzorka DNK ili odgovarajuće pozitivne kontrole u svaku reakcijsku jažicu. Dodajte 3 $\mu$ L sterilne vode u reakcijske jažice negativne kontrole.
- 1.6. Zatvorite reakcijske jažice. Lagano promiješajte vrtloženjem i kratko centrifugiranjem.
- 1.7. Stavite reakcijske jažice u termocikler i pokrenite ga prema propisanim uvjetima navedenim u nastavku.

95 °C – 10 min	} 33 ciklusa
96 °C – 20 s	
60 °C – 30 s	
72 °C – 3 min	
15 °C – održavanje	

- 1.8. Postupak amplifikacije traje oko 2,5 sata u cijelosti.
- 1.9. Kad je PCR dovršen, izvadite reakcijske jažice/pločicu iz termociklera i izravno nastavite s gel-elektroforezom ili pohranite na 4 °C prije nastavka.

**NAPOMENA:** Pročišćavanje amplikona tretmanom ExoSAP treba provesti u roku od 24 sata nakon završetka PCR-a.

### 2. Elektroforeza u agarozom gelu

- 2.1. Provjerite uspješnu amplifikaciju elektroforezom u agaroznom gelu pomoću 2 $\mu$ L svakog PCR produkta u kombinaciji s 5 $\mu$ L dopunskog pufera (prije upotrebe

provjerite alternativne volumene dopunskog pufera). Preporučuje se upotreba gela s 1 % agaroze.

2.2. Broj i očekivane veličine nastalih amplikona varirat će ovisno o lokusu i genotipu uzorka. Očekivane veličine PCR amplikona navedene su u tablici 2.

Lokus	Očekivane veličine trake
HLA-A	≈ 2 kbp
HLA-B	≈ 2 kbp
HLA-C	≈ 1.1 kbp i 1.4 kbp
HLA-DRB1	≈ 450 bp - 850 bp (HH-PD5.2-5) ≈ 630 bp - 980 bp (LG-PD5.2-7) Obrazac traka ovisit će o prisutnosti određenih skupina alela
HLA-DQB1	≈ 300 bp i 500 bp (PQ-PD6.2-2) ≈ 400 bp i 500 bp (AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	≈ 400 bp (HH-PD10.1) ≈ 400 bp, ≈ 780 bp i ≈ 1470 bp (KD-PD10.2-1)

Tablica 2: Očekivane veličine produkta za svako ispitivanje.

### 3. Pročišćavanje produkata PCR-a

**NAPOMENA:** Osim sustava za pročišćavanje ExoSAP-IT<sup>®</sup> ili ExoProStar<sup>™</sup> (npr. Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP ili kolonski sustavi), smiju se upotrebljavati i drugi sustavi za pročišćavanje PCR produkata. Korisnicima se izričito preporučuje da ove postupke validiraju prije nego što ih primijene. Ako će se koristiti tretman ExoSAP, preporučuje se korisnicima da slijede postupak opisan u nastavku.

3.1. Pripremite glavnu smjesu koja se sastoji od 4 $\mu$ L ExoSAP-IT<sup>®</sup> ili ExoProStar<sup>™</sup> i 8 $\mu$ L od 2 mM MgCl<sub>2</sub> po uzorku koji se pročišćava. Lagano pulsirajte na vrtložniku da se promiješa. Razdijelite 12 $\mu$ L glavne reakcijske smjese u jažicu svakog reaktivnog uzorka. Zatvorite jažice, vrtložite i zatim stavite na protresilicu ili lagano vrtložite 2 minute. Kratko centrifugirajte prije stavljanja u termocikler. Pokrenite termocikler prema sljedećem obrascu:

37 °C - 30 min  
80 °C - 15 min  
4 °C - održavanje

3.2. Po završetku razrijedite pročišćeni produkt sterilnom vodom u omjeru 1:4. Ovaj korak razrjeđivanja omogućit će da bude dovoljno predložaka za provođenje reakcija sekvenciranja te da koncentracija predložaka bude dovoljna za dobivanje sekvencijskih podataka dobre kvalitete.

**NAPOMENA:** Ako se stalno primjećuju visoki signali, povezani šum i artefakti, možda je potreban veći faktor razrjeđenja (npr. 1:8). Slabiji PCR produkti mogu zahtijevati niži faktor razrjeđenja.

3.3. Uzorci tretirani postupkom ExoSAP mogu se pohraniti na 4°C prije daljnje upotrebe. Ti se uzorci smiju pohraniti na 4°C do tjedan dana prije upotrebe, ali za dugoročno skladištenje treba ih čuvati na -20°C<sup>9</sup>.

#### 4. Reakcija sekvenciranja

**NAPOMENA:** U slučajevima kada se heterozigotne nejasnoće trebaju razriješiti hemizigotnim početnicama za sekvenciranje poput HARPS-a<sup>®</sup>, potražite upute za upotrebu OLERUP SBT™ HARPS<sup>®</sup>.

4.1. Tablica 3 navodi početnice sekvenciranja koje treba koristiti za pojedini lokus.

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
AEX1F	AEX1R	BEX1F	BEX2F	CEX1F	CEX1R
AEX2F	AEX2R	BEX2R	BEX3F	CEX2F	CEX2R
AEX3F	AEX3R	BEX3R	BEX4F	CEX3F	CEX3R
AEX4F	AEX4R	BEX4R		CEX4F	CEX4R
				CEX5F	CEX5R
				CEX6F	CEX6R
				CEX7F	

HLA-DRB1 <sup>†</sup>		HLA-DQB1		HLA-DPB1	
DRB1EX2F	DRB1EX2R-2	DQB1EX2F	DQB1EX2R	DPB1EX2F	DPB1EX2R
DRB1EX3R-2 <sup>^</sup>	RB-TG344-R <sup>†</sup>	DQB1EX3F	DQB1EX3R		

ili

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

**Tablica 3: Sekvencijske početnice namijenjene su za upotrebu s pojedinim lokusom.**

<sup>†</sup>RB-TG344-R je HARP<sup>®</sup> usmjeren na kodon 86 dimorfizam. Njegova uporaba nije obvezna.

<sup>\*</sup>PB-AG341-R je HARP<sup>®</sup> usmjeren na dimorfizam kodona 85 u DPB1. Njegova je upotreba također neobavezna.

<sup>^</sup>DRB1EX3R-2 je sekvencijska početnica DRB1 u kompletima HH-PD5.2-5 koja se ponaša slično kao HARP i dizajnirana je za sekvenciranje sljedećih alelnih skupina: \*03, \*08, \*11, \*12, \*13, \*14, \*15 i \*16. Ova početnica će proizvesti ili heterozigotne, hemizigotne, ili nikakve podatke o sekvenciranju, ovisno o genotipu uzorka koji se tipizira. Kada se analiziraju podaci dobiveni pomoću DRB1EX3R-2 u ASSIGN™ u odnosu na referencu DRB1-FullX2, dobiveni podaci egzona 3

analizirat će se u zasebnom sloju i omogućiti rješavanje brojnih neodređenosti alela u egzonu 3, kao što je DRB1 \*14:01 naspram \*14:54 neodređenosti. Njegova je upotreba neobavezna ovisno o strategiji tipizacije koju koristi laboratorij. Navedeno se ne primjenjuje na komplete LG-PD5.2-7 jer je na raspolaganju dvosmjerno sekvenciranje za egzon 3.

4.2. Pripremite svježu otopinu smjese sekvencijske početnice na ledu svaki put kad provodite sekvencijsku reakciju. Sastav i volumeni za smjesu navedeni su u nastavku **prema uzorku.**

<b>Komponenta</b>	<b>Volumen</b>
Početnica sekvenciranje	za 2 µL
Sterilna voda	11,5 µL
BigDye® Terminators	1 µL
5 x Seq Rxn Buffer	3,5 µL

4.3. Svaku reakcijsku smjesu za sekvenciranje lagano promiješajte na pulsirajućem vrtložniku.

4.4. Razdijelite 18 µL reakcijske smjese za sekvencioniranje u svaku odgovarajuću reakcijsku jažicu.

**NAPOMENA:** Za postupke koji uključuju nekoliko uzoraka s mnogo početnica za sekvenciranje prihvatljivo je doziranje početnica (2µL) izravno u pojedinačne reakcijske jažice. Zatim se može prirediti glavna smjesa sastavljena od sterilne vode, BigDye® Terminatora i 5 x sekv. pufer, od čega 16 µL treba dozirati u svaku reakcijsku jažicu. Izričito se preporučuje da ovaj alternativni postupak korisnik validira prije primjene.

4.5. Dodati 2 µL pročišćenog PCR proizvoda u svaku odgovarajuću jažicu.

**NAPOMENA:** Važno je paziti da se spriječi unakrsna kontaminacija reakcija sekvenci.

4.6. Zatvorite reakcijsku jažicu, lagano promiješajte i kratko centrifugirajte da se sadržaj smjesti u dno svake reakcijske jažice.

4.7. Stavite reakcijske jažice u termocikler i pokrenite prema sljedećem profilu:

<b>Broj ciklusa</b>	<b>Temperatura i vrijeme</b>
25	96 °C – 10 s 50 °C – 5 s 60 °C – 2 min
1	4 °C – održavanje

4.8. Nakon završetka programa, izvadite reakcijske jažice/pločicu iz termociklera i nastavite izravno s pročišćavanjem reakcijskih produkata ili pohranite na mračno mjesto na 4°C prije nastavka. Preporučuje se da se uzorci pročiste i pokrenu na DNK sekvenceru u roku od 24 sata.

## 5. Pročišćavanje produkata sekvencijske reakcije

**NAPOMENA:** Osim taloženja etanolom, pročišćavanje reakcijskih produkata može se provesti postupcima koji ovdje nisu opisani. Korisnicima se izričito preporučuje da ove postupke validiraju prije nego što ih primijene.



- 5.1. Kratko centrifugirajte reakcijske jažice/pločice prije nego što nastavite. Ako su tijekom termociklusa korišteni poklopci za višekratnu uporabu, označite ih kako biste izbjegli unakrsnu kontaminaciju.
- 5.2. Pažljivo uklonite poklopce.
- 5.3. Svakoj jažici dodajte 5  $\mu$ L 125 mM EDTA, pH 8,0. Pripazite da EDTA dospije na dno jažice.
- 5.4. U svaku reakcijsku jažicu dodajte 60  $\mu$ L 100 %-tnog etanola. Zatvorite jažice/pločicu i vrtložite kratko, ali temeljito kako biste osigurali temeljito miješanje.
- 5.5. Ekstenzijske produkte peletirajte centrifugiranjem na 2000 G tijekom 45 minuta. **ODMAH PRIJEĐITE NA SLJEDEĆI KORAK.** Ako to nije moguće, ponovite centrifugiranje dodatnih 10 minuta prije nego što nastavite s radom.
- 5.6. Uklonite poklopce s reakcijskih jažica i uklonite supernatant okretanjem reakcijskih jažica na papirnati ubrus ili maramicu.
- 5.7. Stavite obrnute reakcijske jažice i papirnati ubrus ili maramicu u centrifugu. Centrifugirajte na 350 G tijekom 1 minute kako biste uklonili ostatak supernatanta.
- 5.8. Izvadite reakcijske jažice iz centrifuge i stavite ih u uspravni položaj na radni stol. Bacite papirnati ubrus tj. maramicu.
- 5.9. Pripremite svježu otopinu 80 %-tnog etanola od apsolutnog etanola i sterilne vode.
- 5.10. Dodajte 60  $\mu$ L 80 %-tnog etanola u svaku jažicu. Zatvorite jažice i kratko ih vrtložite.
- 5.11. Centrifugirajte 5 minuta na 2000 G.
- 5.12. Ponovite korake 5.6 i 5.7.
- 5.13. Izvadite reakcijske jažice iz centrifuge i bacite papirnati ubrus. Zatvorite reakcijske jažice i nastavite s postupkom denaturacije. Inače, možete ih pohraniti na  $-20^{\circ}\text{C}$  na mračnom mjestu<sup>10</sup>. Preporučuje se da se ekstenzijski produkti postave u DNK sekvencer u roku od 24 sata od pokretanja reakcije sekvenciranja.

## 6. Denaturacija i elektroforeza reakcijskih produkata sekvenciranja

**NAPOMENA:** Postupak za denaturaciju ekstenzijskih produkata u Hi-Di™ Formamidu koji je ovdje opisan možda nije potreban ako se ne koriste postupci pročišćavanja metodom taloženja etanolom. Korisnicima se izričito preporučuje da alternativne postupke ispituju prije nego što ih primijene.

- 6.1. U svaku reakcijsku jažicu dodajte 12  $\mu$ L Hi-Di™ Formamida. Jažice/ploče kratko vrtložite i centrifugirajte.
- 6.2. Inkubirajte reakcijske jažice na  $98^{\circ}\text{C}$  5 minuta. Nakon inkubacije pobrinite se da se reakcijske jažice brzo ohlade na sobnu temperaturu (npr. stavite ih na led ili upotrijebite termocikler za izvođenje koraka denaturacije i hlađenja) prije nego što ih stavite u sekvencer. Nakon što se uzorak ponovo suspendira u Hi-Di Formamidu, preporučuje se da se odmah stavi u instrument. Uzorak je u instrumentu stabilan 24 sata<sup>8</sup>.

**NAPOMENA:** Pobrinite se da u reakcijskim jažicama nema mjehurića zraka. Zrak može ući i oštetiti kapilare.

- 6.3. Umetnite reakcijske jažice/pločicu na automatizirani sekvencer i pripremite datoteku za prikupljanje podataka u skladu sa specifikacijama proizvođača sekvencera.
- 6.4. Sljedeći parametri instrumenta su validirani od strane proizvođača pomoću kompleta za sekvenciranje Big Dye® Terminator v3.1 i POP-7™. Navedeni parametri mogu zahtijevati validaciju korisnika za ostale polimere, kemikalije za sekvenciranje i instrumente. Detaljne upute i smjernice potražite u odgovarajućem priručniku za instrumente (npr. provjerite je li postavka za bojenje odgovara kemikalijama koje se koriste, na primjer kemikalije za sekvenciranje v1.1 Big Dye® Terminator zahtijevaju drugačiji set boja).

<b>Parametar</b>	<b>Postavka</b>
Set boja	Z_BigDyeV3
Datoteka za mobilnost	KB_3730_POP7_BDTV3
Basecaller	KB.bcp
Pokretanje modula	Regular FastSeq50_POP7
Vrijeme ubrizgavanja	15 s
Vrijeme rada	3000 s

- 6.5. Upotrijebite softver instrumenta za obrađivanje prikupljenih podataka i stvaranje datoteka sekvenciranja. Detaljne upute i smjernice potražite u korisničkom priručniku odgovarajućeg instrumenta.

## 7. Uređivanje i analiza elektroferograma

Kompleti OLERUP SBT™ dizajnirani su, razvijeni i validirani pomoću softvera OLERUP ASSIGN™ SBT kojeg je proizvela tvrtka CareDx Pty Ltd. Korisnicima se preporučuje upotreba verzije ASSIGN™ SBT 3.6 i novije (ASSIGN™ SBT V4.7 ili OLERUP ASSIGN™ SBT V471), jer ove verzije softvera koriste postavke i referentne datoteke posebno dizajnirane za tipizacijske komplete OLERUP SBT™ i HARPS®. Više pojedinosti o radu ovog softvera potražite u odgovarajućem korisničkom priručniku kojeg možete preuzeti s internetske stranice CareDx (<http://www.CareDx.com>).

Podaci o tipizaciji temeljeni na sekvenciranju generirani s pomoću kompleta za tipiziranje OLERUP SBT™ treba analizirati prema sljedećim referentnim datotekama ASSIGN™ SBT koje omogućuje tvrtka CareDx Pty Ltd:

<b>Test</b>	<b>Šifra proizvoda</b>	<b>Referentna datoteka ASSIGN</b>
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 ili 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

## Radne karakteristike

### Točnost

Paneli do 93 uzoraka iz programa UCLA International DNA Exchange za provjeru stručnosti (2008 - 2010) koji se koriste za interno testiranje za komplete OLERUP SBT™ dali su sljedeće rezultate:

Lokus	Broj testiranih uzoraka	Dijagnostička osjetljivost (% uspješnih PCR-ova)	Dijagnostička specifičnost (% dobivenih genotipova)	Broj nepodudarnih uzoraka	Broj heterozigotnih uzoraka	Broj jedinstvenih alela
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

\*Dva nepodudarna uzorka sadržavala su dodatne informacije o sekvenci izvan egzona 2 koje nije izvijestio program UCLA International DNA Exchange za provjeru stručnosti. Jedan uzorak sadržavao je 131:01, ali je program UCLA International DNA Exchange zabilježio je 13:01. Aleli se razlikuju u egzonima 3 i 4. Drugi uzorak sadržavao je 107:01, ali je program UCLA International DNA Exchange zabilježio je 13:01. Ovi se aleli razlikuju u egzonu 1.

Za komplete OLERUP SBT™ HLA-DRB1 (šifra proizvoda LG-PD5.2-7), korištena je ploča s jažicama za 23 karakterizirana uzorka, koji pokrivaju širok spektar alela. Osim toga, tipizirana je i ploča od 293 uzorka iz vanjskog izvora bez poznavanja *a priori* ostalih podataka za tipiziranje HLA-a. Ovi su uzorci također testirani s kompletom OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2). U slučajevima kad je dobiven homozigotni rezultat, ispitana je povezanost DQB1/DRB1 za te uzorke da bi se potvrdio rezultat kao i da bi se otkrili slučajevi gdje je moglo doći do izostanka alela.

Ispitivanje je dalo sljedeće rezultate:

Lokus	Broj testiranih uzoraka	Dijagnostička osjetljivost	Dijagnostička specifičnost	Broj nepodudarnih uzoraka	Broj heterozigotnih uzoraka	Broj jedinstvenih alela
HLA-DRB1	23	100 %	100 %	0	23	12
	286*	97,9 %	99,6 %	0	253	33

\* Šest uzoraka nije se uspjelo amplificirati zbog loše kvalitete uzoraka DNK. Nađeno je jedan uzorak kontaminiran s DNK iz laboratorija iz kojeg su uzeti uzorci. Zbog onečišćenja, nije se mogao dobiti genotip za taj uzorak.

Analize sekvenci PCR-a, mjesta početnog sekvenciranja i studije evaluacije performansi, nisu identificirale nijedan uobičajen i dobro dokumentiran alel koji nije amplificiran preporučenom uporabom ovih kompleta. Više informacija potražite u dokumentu *OLERUP SBT™ Primer Analysis* koji je dostupan sa svakim referentnim izdanjem OLERUP ASSIGN™ SBT, a možete ga preuzeti s internetske stranice CareDx (<http://www.CareDx.com>).

## Granica detekcija

Preporučena koncentracija genomske DNK velike molekularne mase je 20-100 ng/μL. Interno ispitivanje pokazalo je da se i uzorci s koncentracijom od 5ng/μL mogu upotrijebiti. Ispravni genotipovi dobiveni su također iz nekvalitetne ili fragmentirane DNK.

## Specifičnost

Analitički kompleti CareDx Pty Ltd's OLERUP SBT™ specifični su za ispitivanja lokusa. Upotreba kompleta u skladu s ovim uputama trebala bi amplificirati samo jedan lokus. U većini slučajeva upotreba početnica za sekvenciranje ugrađena u svaki komplet stvorit će tipizaciju HLA za većinu uzoraka bez potrebe za daljnjim razdvajanjem. U slučajevima kad preostaju heterozigotne neodređenosti, preporučuje se upotreba razrjeđivanja početnica sekvenci (poput OLERUP SBT™ HARPS®).

Treba napomenuti da su moguće mutacije na mjestima za amplifikaciju ili sekvenciranje i mogu rezultirati odbacivanjem alela. Uzorci koji sugeriraju homozigotni rezultat tipizacije moraju biti validirani alternativnim postupcima.

## Interferirajuće tvari

Tvrtka CareDx Pty Ltd identificirala je sve poznate potencijalne interferirajuće tvari koje bi mogle utjecati na ispitivanje. Pogledajte tablicu u nastavku.

Inhibitor	Potencijalni izvor	Rizik	Komentari
EDTA	TE pufer, epruvete za prikupljanje krvi	Vrlo nizak	Ponovno suspendirajte DNK u tris-HCl pH8 ili TE s <1mM EDTA. Koristite komercijalne komplete za pripremu DNK iz krvi i/ili izbjegavajte epruvete za prikupljanje krvi EDTA
Alkohol	Etanol, izopropanol, izoamil alkohol	Nizak	Pobrinite se da se peleti ili perle DNK osuše na zraku i vizualno pregledajte ima li kapljica etanola (1 %-tni etanol = 1,25 μL 80 %-tni etanol u PCR reakciji od 100 μL).
Višak soli	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Vrlo nizak	Osigurajte temeljito pranje DNK peleta ili perli 80 %-tnim etanolom. Osigurajte OD 230/260 počevši od genomske DNK ~2
Kaotropne soli	Gvanidinij Cl; MgCl <sub>2</sub> ; urea	Vrlo nizak	Osigurajte temeljito pranje DNK peleta ili perli 80 %-tnim etanolom. Osigurajte OD 230/260 počevši od genomske DNK ~2
Fenol: kloroform	Organsko prenošenje	Vrlo nizak	Komponenta široko korištenog komercijalnog postupka ekstrakcije DNK. Osigurajte temeljito pranje DNK peleta ili perli 80 %-tnim etanolom. Osigurajte OD 230/260 počevši od genomske DNK ~2

Inhibitor	Potencijalni izvor	Rizik	Komentari
Proteini	BSA, PEG, albumin iz krvi	Vrlo nizak	Koristite komercijalne komplete za pripremu iz krvi. Osigurajte OD 260/280 počevši od genomske DNK > 1,8
Hem, hemoglobin, imunoglobulini	Krv	Vrlo nizak	Izbjegavajte korištenje uzoraka krvi koji imaju brzu hemolizu. Koristite komercijalne komplete za pripremu iz krvi. Osigurajte OD 260/280 počevši od genomske DNK > 1,8
Deterdženti/DDT	Na deoksikolat, sarkozil, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-oktil glukozid	Vrlo nizak	Osigurajte temeljito pranje DNK peleta ili perli 80 %-tnim etanolom. Osigurajte OD 230/260 počevši od genomske DNK ~2
Proteaze	Proteinaza K, rukovanje uzorkom	Vrlo nizak	Koristite komercijalne komplete za pripremu DNK iz krvi ili sline. Nosite rukavice u svakom trenutku
Nukleaze	Rukovanje uzorkom, restrikcijski enzimi, mikrokokna nukleaza	Vrlo nizak	Koristite komercijalne komplete za pripremu iz krvi. Nosite rukavice u svakom trenutku
Egzogena DNK/RNK	Prijenos, kontaminacija	Vrlo nizak	Pripremite genomsku DNK u izdvojenom prostoru prije PCR-a
Nosioci	RNK, heparin, glikogen	Vrlo nizak	Koristite komercijalne komplete za pripremu DNK iz krvi i/ili izbjegavajte epruvete za prikupljanje krvi s heparinom.
Višak metalnih iona	Mg <sup>2+</sup> iz PCR pufera, Fe ioni	Vrlo nizak	Osigurajte temeljito pranje DNK peleta ili perli 80 %-tnim etanolom. Osigurajte OD 230/260 počevši od genomske DNK ~2
Antivirusni lijekovi (npr. acyclovir)	Krv	Vrlo nizak	Koristite komercijalne komplete za pripremu iz krvi. Osigurajte OD 260/280 počevši od genomske DNK > 1,8
Prašak za rukavice	Rukavice s prahom	Vrlo nizak	Rukavice bez praha
UV ozračene PCR epruvete	UV obrada PCR epruveta	Vrlo nizak	Izbjegavajte UV obradu plastičnih materijala

## Ograničenja i mjere opreza

- Strogo se preporučuje da korisnik validira sve komplete prije primjene u laboratoriju pomoću uzoraka čiji je tip HLA određen drugim molekularnim postupcima. Posebno, svaka odstupanja od ovog postupka (npr. upotreba alternativnih PCR ili DNK postupaka pročišćavanja) moraju biti validirana od strane korisnika prije primjene.
- Kompleti su validirani pomoću ploča s uzorcima čiji genotipovi pokrivaju širok raspon alela. Međutim, treba napomenuti da se mogu pojaviti rijetki aleli i aleli s polimorfizmima na mjestima amplifikacije i sekvenciranja početnica koji se ne mogu amplificirati ili sekvencirati.
- Priroda tipizacije temeljena na sekvenci HLA je takva da i drugi faktori, osim PCR smjese, mogu rezultirati preferencijalnom amplifikacijom ili odbacivanjem alela. Kao posljedica toga, prividni rezultati homozigotnog tipiziranja trebaju biti provjereni alternativnim metodama i/ili obiteljskim genotipizacijama.

- Pozitivna kontrola (ljudska DNA) i negativna kontrola (sterilna voda) moraju biti uključene u svaki PCR postupak. Pozitivna kontrola mora proizvesti PCR produkt odgovarajuće veličine, ovisno o amplificiranom lokusu, a nastala sekvenca mora biti u skladu s genotipom uzorka. U kontroli negativnog predloška ne smije postojati PCR proizvod ni u jednom pokusu. Ako je traka očita, vjerojatno je u nekom koraku došlo do onečišćenja i postupak se mora ponoviti.
- Povremeno se mogu pojaviti dodatni, slabiji PCR produkti. Ove dodatne trake ne ometaju rezultate ili kvalitetu sekvenciranja.

## Licenca

Kompleti OLERUP SBT™ sadrže GoTaq® Hot Start Polymerase (DNA POL) koju proizvodi Promega Corporation za distribuciju od strane tvrtke CareDx Pty Ltd. Licencirano je za Promega pod američkim patentima 5,338,671 i 5,587,287 i njihovim odgovarajućim inozemnim patentima.

## Bibliografija

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*. Antigeni tkiva **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. Više informacija o programu UCLA DNA Exchange možete pronaći na: <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm>.
7. Trenutni aleli HLA mogu se naći na <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.
8. Web stranica Thermo Fishera (<https://www.thermofisher.com/search/results?query=4311320&persona=DocSupport&type=Product+FAQs> , ID odgovora: E15311)
9. Aktualni protokoli u molekularnoj biologiji (2001) 3, jedinica 15.2.5
10. Internetska stranica tvrtke 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, Cepinskas G, Cecchini EL., Fraser DD, *Translational Research in Pediatrics II: Blood Collection, Processing, Shipping, and Storage*, Pediatrics, April 2013, **131**, 4.
12. Sidstedt M i sur, (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 (pogledajte i citate u njima)
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 (pogledajte i citate u njima)
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



## Otklanjanje poteškoća

Problem	Mogući uzrok	Rješenje
Nema produkta PCR-a ili je slab	DNK slabije kvalitete	Procijenite kvalitetu DNA gel-elektroforezom. Netaknuta DNK treba bi biti približno 3kb s malo ili nikakvih znakova o razmazivanju na gelu. Ponovno ekstrahirajte DNK i ponovite PCR ako je to moguće.
	Nedovoljna količina DNA dodana u PCR.	Provjerite je li koncentracija DNK između 20-100 ng/μL. Ponovno ekstrahirajte DNK i ponovite PCR ako je to moguće.
	Prisutnost PCR inhibitora u genomskoj DNK	Inhibitori PCR-a prisutni su u svim tjelesnim tekućinama, uključujući krv, serum i plazmu. Inhibitori PCR-a predstavljaju raznoliku skupinu tvari različitih svojstava i mehanizma djelovanja. Najčešći inhibitori iz krvi su hemoglobin, IgG i laktoferin. Osim toga, hormoni ili antivirusne supstance poput aciklovira, kao i neki antibiotici, također mogu utjecati na amplifikaciju gena <sup>12,13</sup> . Ne koristite uzorke pune krvi koji sadrže heparin. Pojednostiti potražite u navedenim dokumentima <sup>12,13</sup> , EDTA: može mijenjati koncentracije Mg <sup>2+</sup> i u određenim koncentracijama može inhibirati DNA polimerazu <sup>13</sup> , Općenito, epruvete s Na-citratom omogućuju visokokvalitetne DNK <sup>11</sup> , Metode ekstrakcije/pročišćavanja DNK mogu učinkovito ukloniti PCR inhibitore. Korisnik treba procijeniti metode ekstrakcije/pročišćavanja DNK kako bi se osigurala čistoća uzorka. Ponovno ekstrahirajte DNK i ponovite PCR ako je to moguće.
	DNK polimeraza nije dodana u glavnu smjesu ili je smjesa nedovoljno promiješana prije dodavanja uzorcima.	Ponovite PCR. Pobrinite se da se komponente glavne smjese dodaju i dovoljno promiješaju na vrtložniku.
	Poteškoće s termociklerom	Provjerite parametre za rad termociklera. Pregledajte povijest izvođenja kako biste provjerili je li postupak prerano prekinut. Osigurajte da termocikler djeluje prema specifikacijama proizvođača i da se redovno održava.
	Nije dodan etidijev bromid u gel.	Potopite gel u kupku za bojenje koja sadrži 1 X TBE s 0,5 mg/mL etidijevog bromida. Ocijedite u 1 X TBE prije snimanja gela. Osigurajte da se etidijev bromid doda u gel prije izlivanja.
	DNK uzorci se ispiru ili razrjeđuju u vodi koja može imati blago kiseli pH.	Kad god je to moguće, koristite sterilnu vodu s neutralnim pH.
Nema produkta	DNK slabije kvalitete	Amplifikacija uzoraka vrlo loše kvalitete može

PCR-a ili su slabi za egzonsku traku 3-5 za test KD-PD10.2-1		rezultirati slabom amplifikacijom amplikona egzona 3-5. Tipizacija se i dalje može postići korištenjem podataka o sekvenci egzona 1 i 2. Ponovno ekstrahirajte DNK i ponovite PCR ako je to moguće.
Neispravne veličine trake	Upotrijebljen pogrešan pribor	Provjerite koristi li se odgovarajući komplet.
	Korišten je neispravan program termociklera.	Provjerite parametre za rad termociklera.
	Kontaminacija PCR-a	Provjerite negativnu kontrolu radi dokaza o kontaminaciji. Dekontaminirajte radno područje i ponovite PCR. Ponovite PCR da biste utvrdili izvor kontaminacije. Razmislite o upotrebi svježeg kompleta. Ako se čini da je genska DNK uzorka kontaminirana, ponovno ekstrahirajte ili nabavite alternativni izvor DNK.
Slabi intenzitet elektroferograma	Produkt PCR-a je slab	Provjerite sliku gela. Sekvenciranje slabih PCR traka NIJE preporučljivo jer kvaliteta sekvencije može biti nedovoljna za SBT. Razmislite o upotrebi nižeg faktora razrjeđivanja (npr. 1:2, 1:3) nakon pročišćavanja PCR-a.
	Na sekvenceru je primijenjena nedovoljna količina produkata reakcije	Provjerite parametre sekvencera. Vrijeme ubrizgavanja i napon možda će trebati povećati.
	Poteškoće tijekom pročišćavanja proizvoda sekvenciranja	Budite izuzetno oprezni kada uklanjate supernatant, jer time možete ukloniti i pelete.
Intenzitet signala je previsok (prisutnost visokih fluorescentnih vrhova - artefakata)	Previše PCR proizvoda	Provjerite sliku gela. Razmislite o korištenju višeg faktora razrjeđenja nakon PCR pročišćavanja. Provjerite količinu DNK polimeraze koja se koristi u PCR-u.
	Na sekvenceru je primijenjena nedovoljna količina produkata reakcije.	Provjerite parametre instrumenta. Razmislite o smanjenju vremena ubrizgavanja i napona.
Šum na osnovnoj liniji (jaka pozadina)	Kontaminiran produkt PCR-a	Pogledajte gore navedene korektivne radnje.
	Amplifikacija blisko povezanih HLA gena	Provjerite parametre za rad termociklera.
	Loše pročišćavanje PCR-a	Osigurajte da se obrada kompletom ExoSAP provodi u skladu s uputama za komplet. Osigurajte da se PCR smjesa dobro pomiješa s ExoSAP-om Razmislite o korištenju ExoSAP-a pridržavajući se postupka proizvođača (povećanje količine enzima) ili razmislite o alternativnoj tehnici pročišćavanja.
	Kontaminirane reakcije	Osigurajte da su poduzeti svi koraci za sprečavanje unakrsne kontaminacije. Promijenite vrhove

	sekvenciranja	pipeta kad god je to moguće. Dodajte tekućine na vrhove reakcijskih jažica. Spriječite nastajanje aerosola.
	Kontaminirana početnica sekvenciranja	Provjerite kvalitetu sekvencija ostalih početnica za sekvenciranje i ostalih uzoraka pomoću iste početnice. Razmislite o korištenju svježeg alikvota početnice za sekvenciranje.
	Kontaminirana smjesa Terminator boje ili pufera za sekvenciranje	Ponovite sekvenciranje sa svježim alikvotama reagensa.
	Loše pročišćavanje produkata sekvenciranja.	Ponovite sekvenciranje i osigurajte da se pročišćavanje provodi u skladu s uputama proizvođača.
Prisutnost grudica boje	Loše pročišćavanje produkata sekvenciranja	Pročistite proizvode prema uputama za kompletu. Osigurajte da se proizvodi dovoljno isperu 80 % -tnim etanolom.

## Povezani proizvodi

Proizvod za IVD s CE oznakom

**ASSIGN™ SBT 3.6+**                      Šifra proizvoda: CGX0036+

**ASSIGN™ SBT v4.7**                      Šifra proizvoda: CGX00470

**OLERUP ASSIGN™ SBT v471**      Šifra proizvoda: CGX00471

### **OLERUP SBT™ HARPS®**

Potpuni popis proizvoda potražite u Uputama za upotrebu OLERUP SBT™ HARPS®

Samo za upotrebu u istraživanju:

#### **Kompleti za HLA tipizaciju OLERUP SBT™**

AN-PD11.0-0(20)      Komplet OLERUP SBT™ HLA-DRB3 (20 i 50 testova)  
AN-PD11.0-0(50)

AN-PD12.0-0(20)      Komplet OLERUP SBT™ HLA-DRB4 (20 i 50 testova)  
AN-PD12.0-0(50)

AN-PD13.0-0(20)      Komplet OLERUP SBT™ HLA-DRB5 (20 i 50 testova)  
AN-PD13.0-0(50)

LC-PD2.9(20)              Komplet OLERUP SBT™ HLA-B57 (20 i 50 testova)  
LC-PD2.9(50)

Napomena: navedeni proizvodi imaju licencu za IVD u Australiji

## Laboratorijski reagensi opće namjene

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

SEQ BUF – 2.0(400)      5 x Seq Rxn Buffer  
SEQ BUF – 2.0(5000)  
EDTA – 3.0(200)      125 mM EDTA, pH 8,0  
EDTA – 3.0(5000)

Za dodatne pojedinosti obratite se lokalnom distributeru.



### Samopotvrđeni kompleti:

HH-PD3.2-2(20)	Komplet OLERUP SBT™ HLA-C (20 i 50 testova)
HH-PD3.2-2(50)	
PQ-PD6.2-2(20)	Komplet OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (20 i 50 testova)
PQ-PD6.2-2(50)	
AN-PD6.2-3(20)	
AN-PD6.2-3(50)	
HH-PD10.1(20)	Komplet OLERUP SBT™ HLA-DPB1 (20 i 50 testova)
HH-PD10.1(50)	
KD-PD10.2-1(20)	
KD-PD10.2-1(50)	

## Podaci za kontakt

### Proizvođač

CareDx Pty Ltd  
PO Box 1294  
Fremantle 6959  
Zapadna Australija  
Australija  
Telefon: +61-08-9336-4212  
E-pošta: [orders-aus@caredx.com](mailto:orders-aus@caredx.com)  
Internetska stranica: [www.CareDx.com](http://www.CareDx.com)

Pojedinosti o podršci i naručivanju potražite na internetu na stranici CareDx (<http://www.caredx.com>).